



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VÝVOJ A VALIDÁCIA ANALYTICKEJ
METÓDY PRE HODNOTENIE ČISTOTY
NALBUFIN HYDROCHLORIDU

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE ANALYTICAL METHOD FOR THE
PURITY ASSESSMENT OF NALBUFIN HYDROCHLORIDE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jozef Děd

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Viera Mrázová, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1216/2017 Akademický rok: 2017/18
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Bc. Jozef Děd**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Viera Mrázová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vývoj a validácia analytickej metódy pre hodnotenie čistoty Nalbufin hydrochloridu

Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

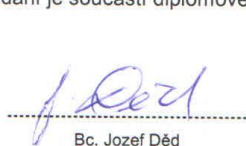
- 1) Nalbufin hydrochlorid - vlastnosti a použití
- 2) Popis kapalinové chromatografie
- 3) Rešerše stanovení nalbufinu hydrochloridu kapalinovou chromatografií
- 4) Opiáty a alkohol
- 5) Stručný přehled stanovovaných validačních parametrů

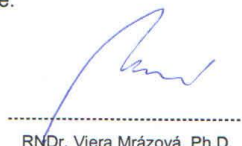
Experimentální část:

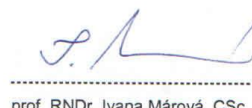
- 1) Vývoj metody stanovení nalbufinu, oxykodonu a noroxykodonu v jedné analýze
- 2) Validace vyvinuté metody
- 3) Vyhodnocení a diskuse získaných výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.


Bc. Jozef Děd
Student


RNDr. Viera Mrázová, Ph.D.
Vedoucí práce


prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31. 1. 2018


prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan

ABSTRAKT

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia sa v súčasnej dobe využíva za účelom analytického hodnotenia liečiv. Je to predovšetkým preto, že ako separačná metóda umožňuje súčasne kvalitatívnu, ako aj kvantitatívnu analýzu hodnotenia zmesi s vysokou selektivitou a citlivosťou. Diplomová práca sa venuje problematike hodnotenia čistoty aktívnej farmaceutickej substancie Nalbufin hydrochloridu. Cieľom experimentálnej časti diplomovej práce bol vývoj a validácia analytickej metódy pre hodnotenie čistoty Nalbufin hydrochloridu. Bola vyvinutá HPLC metóda na kolóne Nova-Pak C18. Mobilná fáza pozostávala z dvoch zložiek A a B. Zloženie MF A bolo nasledujúce: 0,97 g oktansulfonátu sodného sa rozpustilo v 900 mL vody, ku ktorej sa pridalo 100 mL acetonitrilu a 2 mL trietylamínu. Vzniknutý roztok bol upravený kyselinou fosforečnou na pH 2,5. MF B mala nasledujúce zloženie: 0,86 g oktansulfonátu sodného sa rozpustilo v 800 mL vody, ku ktorej sa pridalo 200 mL acetonitrilu a 2 mL TEA. Výsledné pH bolo upravené kyselinou fosforečnou na 2,5. Gradient MF mal nasledujúce zloženie: Od nulte minúty zo 100 %A do 30 min. na 0 %A. V 30-60 min. 0 %A, 60-61 min. s lineárnou zmenou na 100 %A, 61-70 min. ekvilibrácia do pôvodných podmienok na 100 %A pri prietoku 1 mL/min.

V nasledujúcej časti sme hodnotili základné validačné parametre: lineárny dynamický rozsah 0,3 – 4,5 µg/mL, vypočítali sme rovnicu lineárnej regresie pre Nalbufin R^2 (0,9999), Oxykodón R^2 (0,9999) a Noroxykodón R^2 (0,9998). Metóda nám poskytla limity detekcie pre Nalbufin 0,069 µg/mL. Oxykodón mal limit detekcie 0,053 µg/mL a Noroxykodón 0,048 µg/mL. Limity kvantifikácie v týchto prípadoch boli 0,209 µg/mL pre Nalbufin, 0,161 µg/mL pre Oxykodón a 0,147 µg/mL pre Noroxykodón. Stanovená bola aj opakovateľnosť pre limit kvantifikácie vyjadrená relatívnou smerodajnou odchýlkou. Pre Nalbufin - RSD= 0,40%, Oxykodón – RSD= 2,39% a Noroxykodón – RSD= 1,25% (RSD ≤ 7,0%). Nasledujúcim validačným parametrom bola presnosť. Výsledná hodnota RSD bola 0,44% (RSD ≤ 5,0%). Posledným hodnoteným parametrom, bola robustnosť. Pre pH 2,4 bola hodnota zmeny rozlíšenia 1,5% a opakovateľnosť RSD= 0,85%. Hodnota zmeny rozlíšenia pre pH 2,6 bola 2,8% a opakovateľnosť RSD= 1,29% (max. limit 5%). Druhým sledovaným faktorom pre robustnosť bola zmena teploty kolóny. Z jednotlivých plôch pík bol vypočítaný aritmetický priemer a vyhodnotená relatívna smerodajná odchýlka RSD=3,45% spolu so zmenou rozlíšenia, ktorá mala hodnotu 3,34%.

Môžeme teda konštatovať, že vyvinutá chromatografická metóda bola overená v daných validačných parametroch a je vhodná na stanovenie čistoty Nalbufin hydrochloridu.

KEÚČOVÉ SLOVÁ

opiáty, Nalbufin hydrochlorid, HPLC

ABSTRACT

High Performance Liquid Chromatography is currently used for the purpose of analytical evaluation of drugs. This is mainly because it allows the separation method both, a qualitative and a quantitative, analysis of high selectivity mixture evaluation and sensitivity. The diploma thesis deals with the issue of purity evaluation of pharmaceutical substance Nalbuphine hydrochloride. The aim of the experimental part of the diploma thesis deals with the development and validation of the analytical method for assessing the purity of Nalbuphine hydrochloride. An HPLC method was developed on a Nova-Pak C18 column. The mobile phase consisted of two components A and B. MF A composition was as follows: 0.97 g of sodium octane sulfonate was dissolved in 900 mL of water to which were added 100 mL of acetonitrile and 2 mL of triethylamine. Created solution was treated with phosphoric acid to pH 2.5. MF B had the following composition: 0.86g of sodium octanesulfonate was dissolved in 800 mL of water to which 200 mL was added acetonitrile of 2 mL of TEA. The resulting pH was adjusted to pH 2.5 with phosphoric acid. gradient MF had the following composition: From zero minutes from 100% A to 30 min. to 0% A. The 30-60min. 0% A, 60-61 min. with a linear change to 100% A, 61-70 min. equilibrium into the original conditions to 100% A at a flow rate of 1 mL/min.

In the following section we evaluated the basic validation parameters: linear dynamic range 0.3 - 4.5 $\mu\text{g/mL}$, we calculated the linear regression equation for Nalbuphine in R^2 (0.9999), Oxycodone R^2 (0.9999) and Noroxycodone R^2 (0.9998). The method gave us detection limits for Nalbuphine 0.069 $\mu\text{g/mL}$. Oxycodone had a detection limit of 0.053 $\mu\text{g/mL}$ and Noroxycodone 0.048mg / mL. The limit of quantification in these cases were 0.209 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for Nalbuphine, 0.161 $\mu\text{g/mL}$ for Oxycodone and 0.147 $\mu\text{g/mL}$ for Noroxycodone. Repeatability for the limit of quantification was also set expressed by the relative standard deviation. For Nalbuphine - RSD = 0.40%, Oxycodone - RSD = 2.39% and Noroxycodone - RSD = 1.25% (RSD \leq 7.0%). The following validation parameter was accuracy. The resulting RSD was 0.44% (RSD \leq 5.0%). The last evaluated parameter was robustness. For pH 2.4, the change value was resolution of 1.5% and repeatability of RSD = 0.85%. The change of resolution value for pH 2.6 was 2.8% and repeatability RSD = 1.29% (max. 5% limit). The second factor observed for the robustness was the temperature change of the column. The arithmetic average was calculated from the individual peak areas and relative standard deviation RSD = 3.45% was evaluated with the change of resolution, which had a value of 3.34%.

Thus, we can state that the developed chromatographic method has been verified in the given validation parameters and is suitable for determining the purity of Nalbuphine hydrochloride.

KEYWORDS

opiates, Nalbuphine hydrochloride, HPLC

DĚD, J. *Vývoj a validácia analytickej metódy pre hodnotenie čistoty Nalbufin hydrochloridu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 64 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Viera Mrázová, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Touto cestou by som sa chcel srdečne poďakovať svojej konzultantke RNDr. Milene Vespalcovej, PhD. za odborné vedenie diplomovej práce. Úprimná vďaka patrí taktiež pani RNDr. Vieri Mrázovej, PhD. za jej odbornú pomoc, usmernenie a nesmiernu ochotu pri vypracovávaní diplomovej práce.

V neposlednom rade by som sa chcel poďakovať svojej manželke Veronike a dcérke Emke za trpezlivosť a ideálne pracovné prostredie, ktoré mi počas dokončovania práce s láskou vytvárali.

OBSAH

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | ÚVOD | 8 |
| 2 | TEORETICKÁ ČASŤ | 9 |
| 2.1 | Chromatografia | 9 |
| 2.1.1 | História chromatografie | 9 |
| 2.1.2 | Stacionárne a mobilné fázy pre systém kvapalina-kvapalina | 10 |
| 2.1.3 | Separačné metódy | 10 |
| 2.1.4 | Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia | 11 |
| 2.1.5 | Hlavné elučné charakteristiky | 14 |
| 2.2 | Opioidy a opiáty | 16 |
| 2.2.1 | Rozdelenie opioidov | 16 |
| 2.2.2 | Mechanizmus účinku | 16 |
| 2.2.3 | Somatické účinky opioidov | 17 |
| 2.2.4 | Terapeutické využitie opioidov | 18 |
| 2.2.5 | Interakcie opiátov s alkoholom | 18 |
| 2.3 | Vlastnosti a použitie Nalbufin hydrochloridu | 21 |
| 2.3.1 | Fyzikálno - chemické vlastnosti | 21 |
| 2.3.2 | Nalbufin hydrochlorid | 21 |
| 2.3.3 | Spôsob podania a dávkovanie | 22 |
| 2.3.4 | Farmakokinetické vlastnosti | 22 |
| 2.3.5 | Indikácie | 22 |
| 2.4 | Rozličné metódy HPLC stanovenia Nalbufin hydrochloridu v rôznych matriciach | 23 |
| 2.5 | Validácia analytickej metódy | 25 |
| 2.5.1 | Selektivita metódy | 25 |
| 2.5.2 | Správnosť – aritmetický priemer a presnosť – relatívna smerodajná odchýlka | 25 |
| 2.5.3 | Pracovný rozsah | 25 |
| 2.5.4 | Linearita | 26 |
| 2.5.5 | Robustnosť | 26 |
| 2.5.6 | Medza detekcie a kvantifikácie | 26 |
| 3 | CIELE PRÁCE | 28 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 29 |
| 4.1 | Materiál a metódy | 29 |
| 4.1.1 | Prístroje a zariadenia | 29 |
| 4.1.2 | Chemikálie | 29 |
| 4.1.3 | Testované látky | 30 |
| 4.1.4 | Príprava testovaných roztokov | 30 |
| 4.2 | Vývoj metódy | 30 |
| 4.2.1 | Mobilná fáza | 30 |
| 4.2.2 | Chromatografické podmienky | 31 |
| 4.2.3 | HPLC analýza | 33 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3 | Validácia metódy..... | 35 |
| 4.3.1 | Príprava zásobných roztokov štandardov | 35 |
| 4.3.2 | Presnosť | 36 |
| 4.3.3 | Linearita..... | 36 |
| 4.3.4 | Limit detekcie – LOD, limit kvantifikácie – LOQ s opakovateľnosťou stanovenia . | 36 |
| 4.3.5 | Robustnosť | 37 |
| 4.3.6 | Vyhodnotenie, výpočty a chromatogramy..... | 37 |
| 4.4 | Výsledky a diskusia..... | 38 |
| 4.4.1 | Vývoj metódy | 38 |
| 4.4.2 | Validácia metódy..... | 49 |
| 5 | ZÁVER..... | 58 |
| 6 | ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY | 60 |
| 7 | ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A ZNAČIEK | 64 |
| 7.1 | Použité skratky | 64 |

1 ÚVOD

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) je veľmi často využívanou metódou v analytickom hodnotení liečiv. Je to predovšetkým preto, že ako separačná metóda umožňuje súčasne ako kvalitatívne, tak kvantitatívne hodnotenie zložiek zmesi s vysokou selektivitou a citlivosťou v relatívne krátkom čase s relatívne malým množstvom analyzovanej zmesi.

Hlavnou súčasťou systému je kolóna naplnená stacionárnou fázou (SF). Vzorka je po rozpustení nastreknutá do HPLC systému, kde je unášaná mobilnou fázou (MF) na kolónu, na ktorej dochádza k separácii jednotlivých zložiek. Separácia je založená na rozdielnej afinite jednotlivých zložiek ku stacionárnej fáze. Vďaka tejto chromatografickej technike môžeme a vieme stanoviť prítomnosť či koncentráciu jednotlivých zložiek vo vzorke. Doba, počas ktorej separovaný analyt zotrúva na sorbente, závisí od veľkosti interakcií a určuje poradie, v akom vychádza z kolóny. Čím sú väčšie interakcie analytu so stacionárnou fázou, tým väčší je elučný čas, t.j. tým neskôr analyt opúšťa kolónu. Vyseparované analyty sú pomocou detektoru (napr. UV/VIS, hmotnostný, fluorimetrický atď.) zaznamenané ako elučné krivky - píky. Vizuálnym výstupom chromatografu je chromatogram.

Nalbufin hydrochlorid je semisyntetický opioidný agonista-antagonista. Indikuje sa na zmiernenie strednej až ťažkej pooperačnej či popôrodnej bolesti. Vystupuje ako analgetikum pod rôznymi obchodnými názvami ako sú: Nubain, Nalbin, Analin a iné.

V teoretickej časti sa diplomová práca venuje – vlastnostiam a použitiu Nalbufin hydrochloridu, princípu HPLC, interakcii opiátov s alkoholom, no i prehľad základných validačných parametrov.

Experimentálna časť práce sa venuje vývoju a validácii analytickej metódy pre hodnotenie čistoty Nalbufin hydrochloridu.

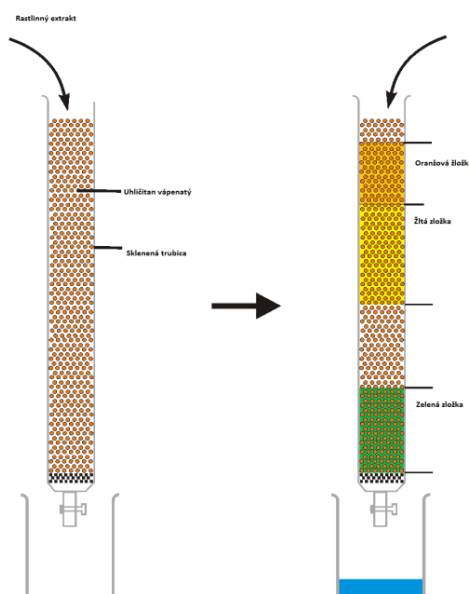
Táto diplomová práca vznikla na základe požiadavky farmaceutickej spoločnosti Saneca pharma a.s., vyvinúť a validovať metódu pre hodnotenie čistoty aktívnej farmaceutickej substancie Nalbufin hydrochlorid.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Chromatografia

2.1.1 História chromatografie

Ruský chemik a botanik Michael Tswett (1872-1919) sa považuje za priekopníka v oblasti chromatografie. V roku 1901 dokázal odseparovať zmes rastlinných farbív na kolóne so stacionárnou fázou z uhličitanu vápenatého na žltú, oranžovú a zelenú zložku. Ako mobilnú fázu v tejto separácii použil petroléter. O niekoľko rokov neskôr použil výraz chromatografia, odvodený z gréckych slov chroma – farba a graphein – písať. [1] Lederer naviazal na jeho prácu až začiatkom 30. rokov a to odseparovaním luteinu a xanthinu z rastlinného extraktu.



Obrázok 1: Tswettsov pokus rozdelenia rastlinného extraktu (prevzaté z [9])

Začiatkom 40. rokov minulého storočia prišlo k veľkému medzníku. Predstavená bola časticová chromatografia pánmi Archer J.P. Martinom a Richardom L.M. Syngomom. Použili kolónu, v ktorej okrem silikagélu bola aj voda. Martin a Syngom spoločne popísali základy plynovo-kvapalinovej chromatografie. [2] Ich práca dala základ ďalšiemu rozvoju chromatografických metód, papierovej chromatografii (Consden et al.), iontovo-výmennej chromatografii (Mayer a Tompkins, Samuelson), elektroforéze (Haugaard a Kroner) a mnohým ďalším. [3]

Janák, Martin a James spolupracovali na vývoji plynovo-kvapalinovej a plynovo-pevnostnej chromatografii. Prvé základy a štúdie týkajúce sa plynovej chromatografie boli publikované až koncom druhej svetovej vojny. Plynová chromatografia našla široké uplatnenie vo vedných odboroch ako sú: chémia, biochémia a iné. Stala sa veľmi kvalitnou separačnou technikou, ktorej úspešné výsledky sa postupne aplikovali aj do starších metód v kvapalinovej chromatografii. Vzhľadom k tomu, že pri separácii sa využívalo vysokých tlakov, bol zavedený termín HPLC. [4]

Históriu chromatografie netvorí teda nejaký sled za sebou idúcich objavov, no je to skôr spleť vzájomne sa inšpirovaných prác a vynálezov.

2.1.2 Stacionárne a mobilné fázy pre systém kvapalina-kvapalina

Podľa polarít stacionárnej fázy sa rozlišujú dve základné usporiadania LLC, a to systém s normálnymi fázami NP (stacionárna fáza je polárna a mobilná fáza je nepolárna) a systém s obrátenými fázami RP (stacionárna fáza je nepolárna a mobilná fáza je polárna).

Ak sa zloženie mobilnej fázy počas elúcie analytu z kolóny nemení a zostáva konštantné, ide o tzv. izokratickú elúciu. Tento typ elúcie sa používa vtedy, ak sa afinita zložiek vzorky k nepohyblivej fáze výrazne nelíši, čiže separujeme látky s približne rovnakými fyzikálno-chemickými vlastnosťami.

Ak sa zloženie mobilnej fázy počas elúcie mení ide o tzv. gradientovú elúciu. Tá sa používa predovšetkým na urýchlenie separačného procesu so značne rozdielnymi chromatografickými vlastnosťami v danom separačnom systéme. Zloženie pohyblivej fázy sa mení tak, aby sa zvyšovala elučná sila. Zmenu zloženia môžeme uskutočniť naprogramovaným pridávaním vzájomne miešateľných rozpúšťadiel alebo roztokov do mobilnej fázy, čím meníme polaritu, pH a iónovú silu pohyblivej fázy. Gradient pridávania môže byť naprogramovaný rôzne a môže mať rozličný priebeh. [5]

2.1.3 Separačné metódy

Separačné metódy sú väčšinou založené na rozdielnej distribúcii látok medzi rôzne nemiešateľné fázy. Zvyšujú selektivitu a špecifickosť v analytickej chémii. Môžeme ich využiť pre kvalitatívnu i kvantitatívnu analýzu.

Chromatografia je separačná (deliaca) a súčasne i analytická metóda. Rozdeľujeme ju na:

- Plynovú chromatografiu (GC) – adsorpčnú a rozdeľovaciu
- Superkritickú fluidnú chromatografiu (SFC)
- Kvapalinovú chromatografiu (LC)
 - kolónová (HPLC) – adsorpčná, rozdeľovacia, gélová permeačná, afinitná, iónovo výmenná a chirálna
 - planárna (plošná) – papierová (PC) a tenkovrstvová (TLC)

Separácia jednotlivých analytov vo vzorke na kolóne a ich postupná detekcia môže prebiehať na základe niekoľkých fyzikálno-chemických princípov.[8]

Adsorpčná chromatografia funguje na základe rozdielných medzimolekulárnych síl medzi jednotlivými zložkami analytu a stacionárnou fázou. Ako sorbent je primárne využívaný silikagel, ktorého veľký povrch zabezpečuje pórovitosť jednotlivých častíc. V adsorpčnej chromatografii sú taktiež využívané materiály ako adsorpčné uhlie, celulóza či uhličitan vápenatý. Platí všeobecné pravidlo, že nepolárne zložky sa eluujú nepolárnou mobilnou fázou.

Rozdeľovacia kvapalinová chromatografia

Princípom separácie zmesi zložiek je ich rôzna rozpustnosť v dvoch vzájomne obmedzene miešateľných kvapalinách, z ktorých jedna je zakotvená na nosiči v podobe tenkého filmu (stacionárna fáza) a druhá preteká cez kolónu (mobilná fáza). Stacionárna kvapalina sa zakotví na nosiči odparením prchavého rozpúšťadla, v ktorom je rozpustená stacionárna

kvapalina a pridaný nosič. Rozdelenie a rýchlosť elúcie potom závisí od rozpustnosti v daných kvapalinách.

Iónovo výmenná chromatografia je určená na separáciu iónov a ďalších nabitých častíc. Častice bez náboja prechádzajú kolónou bez zadržania. Separácia sa uskutočňuje na iónomeničoch, ktoré majú na svojom povrchu chemicky viazané iónové skupiny a na nich sú elektrostatickými silami viazané opačne nabité protiióny. Tieto protiióny sú zhodné s jedným z iónov, ktoré tvoria mobilnú fázu. Protiión je pri separácii dočasne vymenený rovnako nabitým iónom separovanej zložky. Prebytok iónov v mobilnej fáze spôsobí, že ión zložky je z tohto miesta vytesnený a unášaný mobilnou fázou k ďalšej časti sorbentu. Takmer všetky iónové výmeny prebiehajú vo vodných roztokoch. Separované, a teda aj vymieňané môžu byť kladne aj záporne nabité ióny, teda katexy alebo anexy.

Gélová permeačná chromatografia predstavuje najjednoduchší separačný princíp, mechanickej separácie na základe rozdielných veľkostí molekúl delených zložiek. Stacionárna fáza je tuhá látka – gél, ktorý je nasýtený mobilnou fázou. Podstatou metódy je rozdielne prenikanie separovaných molekúl do kvapalnej fázy uzavretej v dutinách gélu. Pri tejto separácii sa uplatňuje „silový efekt“, pri ktorom molekuly menších rozmerov, ako je veľkosť dutín gélu budú difundovať do mobilnej fázy v dutinách gélu a tým sa budú v nich zachytávať a systémom prenikať pomalšie. Molekuly väčšie, prejdú systémom rýchlejšie spolu s mobilnou fázou.

Afinitná chromatografia predstavuje separáciu látok na základe ich špecifických interakcií so stacionárnou fázou. Princípom je špecifická väzba – afinita určitého štruktúrneho proteínového motívu so špecifickým ligandom, kovalentne naviazaným na maticu. Je to teda princíp väzby protilátok s antigénom. Proteíny bez tohto motívu sa za ideálnych podmienok na maticu neviažu, takže selektivita a vysoká rozlišovacia schopnosť, sú pri tejto separačnej technike veľmi vysoké. Často je potrebné hľadať optimálne zloženie premývacieho roztoku, ktorý odstráni nešpecificky naviazané proteíny. Väzba proteínu je dočasná, takže so zmenou zloženia mobilnej fázy je proteín z kolóny vytesnený. Elučný roztok pôsobí nešpecificky, t.j. zmenou iónovej sily, pH či polarity, alebo vyviazanie proteínu spôsobuje väzba s kompetitívnym ligandom.

Chirálna chromatografia reprezentuje separáciu dvoch stereoizomérov od seba navzájom. V tomto prípade musí byť chirálna stacionárna alebo mobilná fáza. To dosiahneme naviazaním chirálnej látky na achirálnu, t.j. silikagel. [21][22][23]

2.1.4 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia

Chromatografia je analytická metóda separácie látok. Separované látky sa rozdeľujú medzi dve fázy, z ktorej jedna je nepohyblivá (stacionárna) a druhá (mobilná) pohybuje sa v definovanom smere.

Kvapalinová chromatografia (LC) je separačná metóda, kde pohyblivou fázou je kvapalina a nepohyblivou tuhá látka alebo kvapalina zakotvená na inertnom nosiči. Pri prechode separovaného analytu kolónou prejde každá molekula vzorky mnohokrát z pretekajúcej fázy do sorbentu a späť. Doba, počas ktorej separovaný analyt zotrúva na sorbente, závisí od veľkosti interakcií a určuje poradie, v akom vychádza z kolóny. Čím sú väčšie interakcie analytu so stacionárnou fázou, tým väčší je elučný čas, t.j. tým neskôr analyt opúšťa kolónu.

Ak sa od seba dostatočne líšia distribučné konštanty delených analytov, dôjde po určitom čase k ich čiastočnému až úplnému rozdeleniu do izolovaných pásov – zón. Po výstupe prvého analytu z kolóny indikuje jeho prítomnosť v eluáte detektor a zaznamenáva elučný pík. Obidva rozdelené analyty sú záznamovým zariadením zaznačené ako dve elučné krivky. Vizuálnym výstupom chromatografu je chromatogram. V prípade optimálnej separácie, jednotlivé píky chromatogramu zodpovedajú jednotlivým zložkám separovanej zmesi. Zóny separovaných látok sa počas prechodu kolónou rozširujú. Zóne analytu odpovedá pík, ktorý charakterizuje koncentračný profil analytu v zóne. Šírka píkov odráža šírku zóny príslušného analytu v kolóne. [6] [7]

V kvapalinovej chromatografii je mobilnou fázou kvapalina. Na rozdiel od plynovej chromatografie rozhodujú o separácii zložiek vzoriek nie len ich interakcie so stacionárnou fázou, ale veľmi výrazne aj použitá mobilná fáza. Separačné delenie prebieha v separačnej kolóne, ktorá obsahuje stacionárnu (nepohyblivú) fázu – sorbent a mobilnú (pohyblivú) fázu – eluent. Rozdielne analyty majú rozdielnú afinitu ku stacionárnej fáze. Rozdielne analyty podliehajú rôznej distribúcii medzi mobilnú a stacionárnu fázu. Rozdielne analyty sú rozdielne zadržiavané a rozlične zabrzďované.

V chromatografickej kolóne môžu prebiehať rôzne druhy interakcií ako napríklad hydrofóbne interakcie (van der Waalsove sily), interakcie dipól – dipól, vodíkové väzby alebo elektrostatické interakcie. [6]

Pretože je možno pracovať za laboratórnej teploty bez nutnosti prevádzať vzorku na plyn je kvapalinová chromatografia vhodná aj pre separáciu tepelne nestálych a netečúcich zlúčenín. Pracuje sa obvykle elučnou metódou.

V kvapalinovej chromatografii je nižší príspevok molekulárnej difúzie zložky ako v plynnej, pretože kvapalina má vyššiu viskozitu ako plyn. [7]

Poznáme dva typy kvapalinovej chromatografie:

- chromatografiu s normálnymi fázami (NPC) – mobilná fáza je nepolárna a stacionárna polárna,



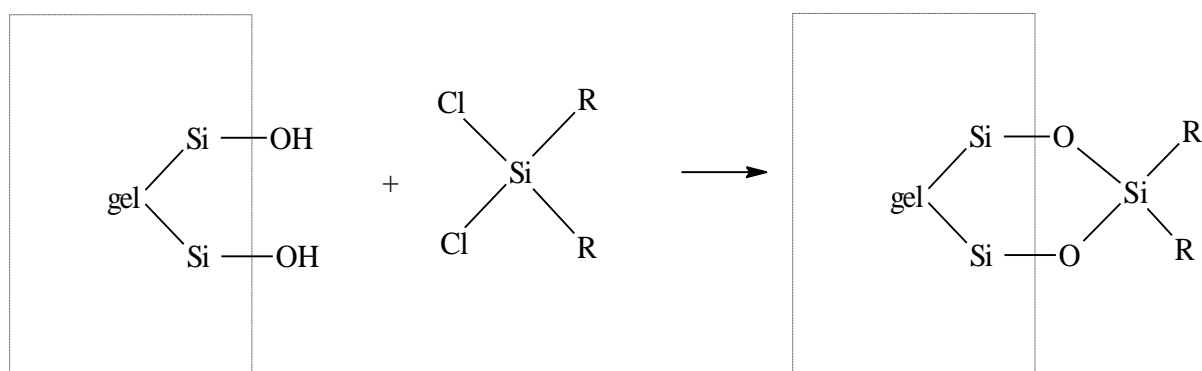
Obrázok 2: Prístroj pre vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu Dionex Ultimate 3000 – dávkovacie zariadenie, čerpadlo, termostat, detektor, software

- chromatografiu s reverznými fázami (RPC) – mobilná fáza je polárna a stacionárna nepolárna.

Keďže je to veľmi citlivá metóda, postačujú k analýze vzorky o objeme niekoľkých mikrolitrov. Moderné HPLC prístroje obsahujú automatické dávkovače – autosamplery a cez počítačový program sa uskutočňujú dané analýzy bez obsluhy. Výsledkom analýzy je vždy chromatogram. Zóny, kde sa vyskytujú analyzované látky, označujeme ako elučné krivky alebo píky. Ak je pík ideálny, tak je ostrý, symetrický, bez chvostovania a má minimálnu šírku pri základni. Kvôli týmto vlastnostiam píkovej je nutné často optimalizovať chromatografické podmienky.

Pred samotnou analýzou je potrebné odvzdušniť mobilnú fázu, aby nedochádzalo počas analýzy k zmenám tlaku, čím sa znehodnocuje analýza. V HPLC sa používajú vysokotlakové čerpadlá a pracujú pri tlakoch do 400 bar. Mobilná fáza musí mať konštantný a bezpulzný prietok. Eluent prechádza z čerpadla do dávkovacieho zariadenia. Dávkovanie vzorky sa uskutočňuje špeciálnou injekčnou striekačkou alebo pomocou automatického dávkovača – autosamplera. [8] [9]

Samotná separácia vzoriek prebieha na kolóne, ktorá je dlhá zväčša 10 – 25 cm, s veľkosťou častíc 3 – 10 μm a jej vnútorný priemer sa pohybuje od niekoľkých milimetrov po približne 1 cm. Čím väčší je vnútorný priemer kolóny, tým sa rýchlosť prietoku znižuje, píky chromatogramu sa rozširujú a znižuje sa aj citlivosť kolóny. Kolóny sa väčšinou vyrábajú z inertného materiálu ako napríklad nerezová oceľ alebo môžu byť aj zo skla či plastu. Vo vnútri kolóny sa nachádza stacionárna fáza, ktorú tvoria polymérne častice alebo najčastejšie mikročastice silikagélu. Na povrchu silikagélu sa nachádzajú hydroxylové skupiny, na ktoré sa pomocou silylácie viažu rôzne skupiny. Väčšinou sú to uhlíkovodíkové reťazce obsahujúce 18 (oktadecyl) alebo 8 (oktyl) atómov uhlíka.



Obrázok 3: Silylácia silikagélu (prevzaté z [12])

Eluát prechádza z kolóny do detektoru, ktorý trvale meria určitú fyzikálnu vlastnosť akou je napríklad index lomu, absorbanca, vodivosť, fluorescencia a podobne. Detektory sú v HPLC vysoko citlivé a majú čo najnižšiu medzu detekcie, ich signál musí byť reprodukovateľný a stabilný, pre analyt by mali byť selektívne. Poznáme absorpčný fotometrický detektor, fluorimetrický detektor, refraktometrický detektor, ampérometrický detektor, vodivostný detektor, detektor s diódovým poľom (DAD) alebo hmotnostný spektrometer ako detektor. [7] [8] [9]

Signály z detektoru spracúvajú počítačové softvéry – vyhodnocovacie zariadenia, ktoré prevádzajú hodnoty, zaznamenané do chromatogramu. Najčastejšie sa používa DAD detektor s diódovým poľom, ktorého výsledkom je 3D chromatogram a ten predstavuje závislosť absorpcie na vlnovej dĺžke a retenčnom čase. Keď sa skončí separácia a vyhodnotia sa signály, tak sa eluent vymyje do zásobníku na odpad.

Elúcia zabezpečuje vymývanie látok z kolóny a mobilná fáza, ktorá sa tiež nazýva eluent alebo elučné činidlo, zabezpečuje eluovanie. Sú dva typy elúcie v HPLC:

- izokratická elúcia – počas trvania celej analýzy je mobilná fáza konštantná a nemení sa
- gradientová elúcia – počas analýzy sa zloženie mobilnej fázy mení, čo je potrebné pri komplikovaných matriciach, ide o plynulé pridávanie rastúceho množstva zložky mobilnej fázy s väčším elučným účinkom do druhej zložky mobilnej fázy, týmto sa vytvorí plynulý koncentračný gradient mobilnej fázy. [7] [8] [9] [10]

2.1.5 Hlavné elučné charakteristiky

Chromatografické vlastnosti separovaných látok charakterizujú elučné charakteristiky. Veličiny patriace medzi základné elučné charakteristiky:

Elučný (retenčný) čas t_R : Je to čas, ktorý uplynie od momentu nadávkovania vzorky, až po vymytie vzorky z chromatografickej kolóny a v jej maximálnej koncentrácii. Je závislý od rýchlosti prietoku mobilnej fázy a rozmerov kolóny. Čím lepšie analyt reaguje so stacionárnou fázou, tým viac sa zadrží v kolóne a hodnota retenčného času je vyššia.

Elučný (retenčný) objem V_R : Je to objem mobilnej fázy pretečený cez kolónu, od nadávkovania vzorky, až kým sa vzorka nevymyje z kolóny a v jej maximálnej koncentrácii. Je to teda objem, ktorý je potrebný na elúciu vzorky z kolóny. Vypočítame ho podľa vzťahu (1):

$$V_R = F_M t_R \quad (1)$$

F_M je veličina, predstavuje objemový prietok mobilnej fázy v kolóne.

Mŕtvy elučný čas t_M : Je to čas materiálu, ktorý nie je zadržiavaný v kolóne. Čiže rýchlosť zvolenej mobilnej fázy je rovnaká ako rýchlosť materiálu v danom chromatografickom systéme.

Mŕtvy elučný objem V_M : Je to množstvo mobilnej fázy v kolóne. Jeho hodnota je závislá od veľkosti častíc v stacionárnej fáze. Vypočítame ho podľa vzťahu (2):

$$V_M = F_M t_M \quad (2)$$

Redukovaný elučný čas t'_R : Je to časový úsek, v priebehu ktorého je vzorka zadržiavaná stacionárnou fázou. Vypočítame ho podľa vzťahu (3):

$$t'_R = t_R - t_M \quad (3)$$

Redukovaný elučný objem V'_R : Je vyjadrený rozdielom elučného objemu a mŕtveho objemu, vypočítame ho podľa vzťahu (4):

$$V'_R = V_R - V_M \quad (4)$$

Existujú i relatívne elučné charakteristiky, ktoré sú nezávislé od parametrov ako sú rýchlosť mobilnej fázy alebo dĺžka chromatografickej kolóny, čo je ich výhodou. Je možné ich použiť pri porovnávaní viacerých meraní v rôznych laboratóriách. Medzi tieto veličiny patria:

Retenčný (kapacitný) faktor k : Je to pomer dvoch látkových množstiev vzorky v mobilnej a v stacionárnej fáze. Hovoríme o faktore slúžiacom na zhodnotenie interakcie vzorky so stacionárnou fázou. Čiže látkové množstvo vzorky v stacionárnej fáze je priamo úmerné časovému úseku, keď sa vzorka nachádza v stacionárnej fáze, z toho vyplýva, že látkové množstvo vzorky v mobilnej fáze je priamo úmerné časovému úseku, keď sa vzorka nachádza v mobilnej fáze. Na základe toho sa retenčný faktor vypočíta podľa vzťahu (5):

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (5)$$

Retardačný (zbrzd'ovací) faktor R_f : Charakterizuje rýchlosť vzorky v kolóne vzhľadom na rýchlosť mobilnej fázy. Vypočítame ho podľa vzťahu (6):

$$R_f = \frac{u_i}{u} \quad (6)$$

u vyjadruje rýchlosť mobilnej fázy a u_i rýchlosť danej vzorky v kolóne.

Rozlišovací faktor ($R_{i,j}$) : Charakterizuje separáciu dvoch vzoriek eluujúcich pri sebe v definovanom chromatografickom systéme. Vypočítame ho podľa vzťahu (7):

$$R_{i,j} = \frac{k_j}{k_i} \quad (7)$$

kde k_i vyjadruje retenčný pomer v poradí prvej eluovanej vzorky a k_j retenčný pomer druhej eluovanej vzorky. Na to, aby sme kvalitatívne mohli vyhodnotiť separované vzorky, by mala byť hodnota rozlišovacieho faktoru aspoň 1,5. Pri tejto hodnote sa píky dvoch separovaných vzoriek, ktoré po sebe eluujú, neprekrývajú a sú úplne rozlíšiteľné na chromatograme.

Počet teoretických priehradiek n : Teoretická priehradka je pomyselná časť chromatografickej kolóny, kde prichádza k jednej teoretickej separácii analytu medzi fázou stacionárnu a mobilnú a následne dôjde k ustáleniu rovnováhy separovaného analytu medzi oboma fázami. Počet teoretických priehradiek vypočítame podľa vzťahu (8):

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{Y} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{Y_{\frac{h}{2}}} \right)^2 \quad (8)$$

t_R vyjadruje elučný čas analytu, Y vyjadruje šírku píku analytu pri základni a $Y_{\frac{h}{2}}$ vyjadruje šírku píku analytu v polovičnej výške.

Termodynamika separácie sa zaoberá vplyvmi, ktoré ovplyvňujú veľkosť interakcie medzi sorbentom a analytom, zadržiavanie (retenciu) a zbrzd'ovanie (retardáciu) analytov, rýchlosť migrácie analytov kolónou, rozdiel v retenčných časoch analytov a delenie analytov od seba navzájom.

Kinetika separácie sa zaoberá vplyvmi, ktoré ovplyvňujú rozširovanie (rozmyvanie) zón analytov behom postupu kolónou a šírky píkovej v chromatograme.

Termodynamika a kinetika separácie spolu úzko súvisia a obidve určujú ako veľmi sa susedné píky v chromatograme prekrývajú, t. j. ako dokonalé alebo nedokonalé sú zóny susedných analytov vzájomne oddelené. [6] [11] [12]

2.2 Opioidy a opiáty

Názov ópium je odvodené z gréckeho slova „opion“, čo znamená maková šťava. Najstaršie zachované zbytky makových semien pochádzajú zo švajčiarskych stavieb v období neolitu. Nálezy sa morfológicky podobajú maku štetinatému, ktorý je považovaný za predchodcu maka siateho. Z tejto doby neexistujú správy o tom, či sa tento mak pestoval iba pre olejnaté semená, alebo tiež pre svoje omamné a bolest' t'šiacie vlastnosti.

Historicky prvá zmienka o požívaní šťavy z makovíc sa nachádza v starom sumerskom texte (asi 4000 rokov pred n.l.).

V roku 1803 sa podarilo nemeckému lekárovi Sertürnerovi izolovať z ópia jeho hlavný alkaloid, ktorý pre jeho vlastnosti pomenoval po gréckom bohu spánku Morfeovi morfiom.

Na prelome 19. a 20. storočia nastala v Európe prvá morfiová vlna a v 20. rokoch ďalšia, druhá morfiová vlna.

Okolo roku 1898 bol ako liek proti kašľu predstavený polysyntetický derivát morfinu 3,6-diacetylmorfin (heroín). Heroín potlačoval abstinenčné príznaky u morfinistov. Dnes je heroín považovaný za jednu z najnebezpečnejších návykových látok vôbec. Drogovú závislosť opiátového typu môže vyvolať celá rada látok prírodného i syntetického pôvodu. [13]

Termín *opiáty* je všeobecne využívaný v užšom slova zmysle pre morfin, heroín, kodeín a látky izolované z ópia. Pojem *opioidy* sa potom vzťahuje ku všetkým prírodným a syntetickým substanciam, ktoré majú účinky podobné morfinu. [14]

2.2.1 Rozdelenie opioidov

Opioidy môžeme rozdeliť nasledujúcim spôsobom:

- *Staršie opioidy*
 - a) Prírodného pôvodu: ópium, morfin, kodeín
 - b) Syntetické deriváty:
 - I. Látky odvodené od morfinu: heroín, hydromorfon, oxymorfon, hydrokodón, oxykodón, dihydrokodeín
 - II. Látky odvodené od pethidinu: pethidin, anileridin, difenoxylát, fentanyl, loperamid
 - III. Ďalšie: pentazocin, butorfanol, nalbuprin, naloxon, naltrexon, buprenorfin, propoxyfen, dextrometorfan
- *Novšie opioidy*
 - tilidín, tramadol, pentamorfon, dezocin, dextromoramid

2.2.2 Mechanizmus účinku

Mechanizmus účinku je daný väzbou látky na opioidné receptory, ktoré sa vyskytujú v celom centrálnom nervovom systéme. Opioidné receptory existujú vo viacerých podtypoch:

- μ (mí receptory) – stimulácia vyvoláva analgetické účinky, vedie k eufórii, sedácii, útlmu dychového centra. Sú zodpovedné za vznik závislosti.
- δ (delta receptory) – sú lokalizované periférne a podieľajú sa na analgézií.
- κ (kappa receptory) – podieľajú sa na analgézií na úrovni miechy. Vedú k sedácii a dysfórii.
- σ (sigma receptory) – podieľajú sa na pôsobení niektorých sympatomimetík a na dysfórii spôsobenej opioidmi. [15]

Podľa pomeru afinity a vnútornej aktivity (sily aktivácie receptoru) sa opioidy delia na niekoľko skupín:

- **agonisty** – majú silnú afinitu aj vnútornú aktivitu, vyvolávajú typické účinky opiátov (morfin, kodeín)
- **antagonisty** – majú silnú afinitu ale nulovú vnútornú aktivitu, blokujú teda receptor a zabráni účinku iného opioidu, preto sa užívajú ako liek pri predávkovaní (naloxon)
- **čiasťoný agonisty** – **antagonisty** - viažu sa na receptory, niektoré aktivujú a iné blokujú (butorphanol, pentazocin)
- **čiasťoný antagonisty** – majú pevnú väzbu na receptor, ale slabú vnútornú aktivitu (buprenorfin)

Mechanizmus účinku na bunkovej úrovni – o mechanizme pôsobenia opioidov na úrovni buniek je známe, že obsadením opioidného receptora agonisticky pôsobiacim opioidom sa prostredníctvom G-proteínu buď zvýši permeabilita membrány presynaptického nervového zakončenia pre K^+ , alebo sa zníži jej priepustnosť pre Ca^{2+} , takže sa membrána ťažšie depolarizuje. To znižuje prenos vzruchu v synapsii. [16]

2.2.3 Somatické účinky opioidov

Somatické účinky (plne platí iba pre opioidné agonisty, u čiasťoných agonistov je efekt modifikovaný predovšetkým do kvantity, u agonistov – antagonistov aj čo do kvality).

Útlm CNS – opioidy potláčajú perцепčné a lokalizačné vnímanie bolesti (schopnosť vnímať a určiť miesto), ako aj psychickú a emocionálnu zložku bolesti, pôsobia sedáciu až ospalosť a eufóriu. Spôsobujú depresiu dychového centra, pokles citlivosti na dráždivý účinok acidózy a CO_2 . Môže dôjsť až k zástave dýchania. Opioidy tlmia centrum pre kašeľ, dráždia zónu pre vracanie, vyvolávajú miózu (stiahnutie zornice do typickej veľkosti špendlíkovej hlavičky), centrálnie tiež hypotermiu – pokles telesnej teploty.

Krvný obeh – vazodilatácia (zväčšenie priesvitu cievneho riečiska), bradykardia (spomalenie srdcovej činnosti), a tým hypotenzia (zníženie krvného tlaku). V toxických dávkach pri hypoxii (nedostatok kyslíka a pokles parciálneho tlaku v krvi), môže dôjsť k poškodeniu vegetatívnych centier mozgu, ktoré riadia srdcovú činnosť a k zástave krvného obehu.

Dýchanie – opioidy svojim centrálnym účinkom znižujú dychovú frekvenciu a zmenšujú dychový objem. Dôsledkom toho môže byť intoxikovaný až cyanotický (modrofialové

sfarbenie kože spôsobené nedostatočným okysličením červených krviniek). Znížená ventilácia pľúc a pokles motility hladkého svalstva riasinkovitého epitelu býva častou príčinou pneumónií (zápalu pľúc). Špecifickým efektom je bronchokonstrikcia (zúženie priesvitu dýchacích ciest, u astmatikov môže vyvolať astmatický záchvat a dusenie).

Tráviaci trakt – opioidy vyvolávajú zápchu (zníženie motility a zvýšenie tonu hladkého svalstva črevnej steny). Vzostup napätia Oddiho sfinkteru (zvieráč pri vyústení žlčovodu do dvanástnika) môže vyvolať biliárnu koliku (zaklínenie žlčového kameňa v žlčovode).

Urogenitálny trakt - znížená produkcia a retencia moču v dôsledku vzostupu napätia svaloviny močového mechúra. Dochádza tiež k zvýšeniu tonu maternice a k poklesu motility riasinkového epitelu vo vajcovodoch a tým k sterilite.

Koža – svrbenie, typické je škriabanie sa po celom tele, dokonca aj v stave bezvedomia.[17][20]

2.2.4 Terapeutické využitie opioidov

Morfín a ostatné opioidné analgetiká sa, ako už z názvu vyplýva, používajú pri úľave od ťažkej neustupujúcej bolesti. Intravenózne (vnútrožilovo) podaný morfín poskytuje výraznú úľavu pri stavoch dýchavičnosti v dôsledku pľúcneho edému sprevádzajúceho ľavostranné srdcové zlyhanie.

Opioidné analgetiká taktiež potláčajú kašeľ. V posledných rokoch sa však od ich využitia v tejto indikácii upúšťa, pretože boli vyvinuté mnohé iné účinné syntetické liečivá, ktoré nespôsobujú závislosť, teda nie sú návykové. Ich ďalším využitím je liečba hnačky prakticky akejkolvek etiológie. Výnimkou sú infekčné hnačky, kedy ich použitie je kontraindikované z dôvodu retencie patogéna v tráviacom trakte. Pre sedatívne, anxiolytické a analgetické účinky sa opioidy, vrátane morfinu, používajú ako premedikácia pred anestéziou a chirurgickými výkonmi. Opioidy majú široké uplatnenie aj ako anestetiká, buď to primárne celkové anestetiká, alebo ako doplnok k iným anestetikám.

Metadon a buprenorphin sa uplatňujú pri substitučnej liečbe abstinenčných stavov.[14] [17]

2.2.5 Interakcie opiátov s alkoholom

Interakcia liekov s alkoholom je závažný a v praxi častý problém.

Alkohol, v tomto kontexte etanol, je sedatívne-hypnotická látka ľuďstvu známa už po tisícročia. V Európe boli počas stredoveku pivo a víno hlavným zdrojom príjmu tekutín. Okrem toho sa alkohol využíval ako liečivo pri najrôznejších ochoreniach. V súčasnosti je etanol široko spoločensky tolerovanou a legálnou drogou, ktorá vedie k jeho nadužívaniu spojenému s mnohými zdravotnými, sociálnymi a ekonomickými problémami. [27]

Účinky etanolu v organizme:

- I. CNS: Etanol zásadným spôsobom ovplyvňuje centrálny nervový systém, na ktorý pôsobí tlmivo. Zdanlivo excitačný účinok nízkych koncentrácií etanolu je dôsledkom útľmu inhibičnej aktivity mozgu. Zvyšujúca sa koncentrácia etanolu vedie

k prehĺbeniu útlmu nervových funkcií a navodí až stav celkovej anestézie. Koncentrácia etanolu v krvi 3-5 g/l znamená silnú intoxikáciu, pri ktorej nastáva kóma, depresia dychového centra až smrť.

Ovplyvnenie funkcií CNS je dané priamym pôsobením etanolu na iónové kanály a receptory:

- etanol potencuje inhibičné pôsobenie GABA na GABA_A-receptoroch (podobne ako benzodiazepíny)
- etanol inhibuje glutamátové receptory, resp. inhibuje schopnosť glutamátu otvárať kationové kanály spojené s glutamátovými receptormi, ktorými sú ovplyvnené kognitívne funkcie
- v neurónoch etanol inhibuje otváranie napäťovo riadených vápnikových kanálov, čím inhibuje vedenie vzruchu a odpoveď naň
- aktivácia acetylcholínových nikotínových receptorov a serotonínových receptorov, aktivácia opioidového systému
- Pozn.: Chronické požívanie alkoholu navodzuje v neurónoch presne opačné účinky ako sú vyššie uvedené účinky akútneho užitia alkoholu, aj keď ovplyvnené molekulárne systémy sú rovnaké.

- II. Kardiovaskulárny systém: hlavným účinkom etanolu je kožná vazodilatácia (rozšírenie prievodu ciev), objavuje sa sčervenanie kože, pocit tepla, pri nízkych teplotách okolia dochádza k podchladeniu. Tlak krvi ani srdcový výdaj sa po malých dávkach alkoholu nemení, zhoršená kontraktilita (schopnosť sťahu) myokardu (srdcového svalu) sa objavuje až pri koncentrácii 1g/l alkoholu v krvi. Oproti tomu pravidelná konzumácia malých dávok alkoholu (cca 1-2 dcl vína), zvyšuje koncentráciu anti-aterogénneho HDL-cholesterolu v plazme. V toto prípade by teda mohol mať etanol protektívny vplyv pri vzniku a rozvoji kardiovaskulárnych ochorení.
- III. Hladké svalstvo: Relaxácia hladkého svalstva je čiastočne entrálneho pôvodu, ďalej vzniká priamym pôsobením acetaldehydu, hlavného metabolitu etanolu, na hladkú svalovinu.
- IV. Gastrointestinálny trakt: etanol zvyšuje saliváciu, žalúdočnú a pankreatickú sekréciu. Toto sa deje reflexne, jednak chuťou alkoholu, jednak podráždením senzorických nervových zakončení v bukálnej a žalúdočnej sliznici.
- V. Obličky: zvýšené močenie v dôsledku útlmu sekrécie ADH (antidiuretického hormónu), na tento účinok etanolu vzniká rýchlo tolerancia. [16] [20]

Interakcie liekov s alkoholom:

Alkohol vstupuje do interakcie s liekmi trojakým spôsobom:

1. Spomaľuje metabolizmus lieku pri intoxikácii etanolom, alebo naopak je spomalené odbúranie etanolu. Alkohol môže byť kompetitívnym inhibítorom biodegradácie liekov.

2. Zrýchlenie metabolizmu lieku pri intoxikácii alkoholom. Táto situácia vedie k nižšiemu účinku liečiva.
3. Zosilnenie nežiadúcich účinkov alkoholu/ liečiva pri vzájomnej interakcii. [28]

Z vyššie uvedeného vyplýva, že účinky etanolu a opioidov sa v organizme stretajú najmä na úrovni CNS.

Alkohol potencuje sedatívne účinky opioidov ako aj útlm dýchacieho centra. V krajných prípadoch môže viesť k závažným poruchám vedomia až k smrti.

2.3 Vlastnosti a použitie Nalbufin hydrochloridu

2.3.1 Fyzikálno - chemické vlastnosti

Systematický názov: (5 α ,6 α)-17-(Cyklobutylmetyl)-4,5-epoxymorfinan-3,6,14-triolhydrochlorid

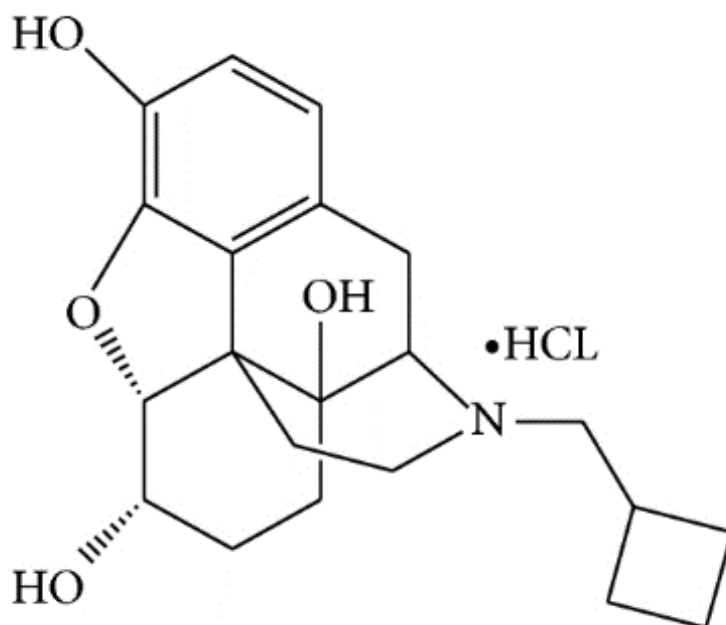
Sumárny vzorec: C₂₁H₂₇NO₄ · HCl

Molekulová hmotnosť: 393,9[g/mol]

Teplota topenia: 228-235°C

Rozpustnosť vo vode: 2,09 mg/ml pri teplote 25°C

Rozpustnosť: a) dobre rozpustný – voda, metanol a etanol
b) nerozpustný – chloroform, éter [24][26]



Obrázok 4: Základná štruktúra nalbufin hydrochloridu (prevzaté z [25])

2.3.2 Nalbufin hydrochlorid

Nalbufin je opioidné analgetikum zo skupiny morfinanov, ktorý je agonistom κ receptorov a antagonistom μ receptorov. Antagonistické účinky nalbufinu dosahujú asi štvrtinu účinku nalorfinu a desaťnásobok účinku pentazocínu. V porovnaní s pentazocínom má nižšie dysforické účinky.

Výhodou podávania nalbufinu je fakt, že jeho potenciál na vyvolanie závislosti je minimálny, neovplyvňuje hladkú svalovinu tráviaceho traktu, močových ciest, minimálne ovplyvňuje vyprázdňovanie žalúdka, črevnú pasáž a močenie. Intramuskulárne podanie 10 mg nalbufinu má podobný analgetický účinok ako 10 mg morfinu. Maximálne stropové množstvo nalbufinu na dosiahnutie analgetického účinku je 30 mg.

Psychomimetické účinky sa vyskytujú pri dávke vyššej ako 70 mg. U pacientov, ktorým sú podávané opioidné analgetiká zo skupiny agonistov μ receptorov nalbufin vyvoláva abstinenčný syndróm. [18][20]

2.3.3 Spôsob podania a dávkovanie

Nalbufin sa podáva parenterálne (intravenózne, intramuskulárne alebo subkutánne). Parenterálne sa odporúča pre dospelých pacientov dávka 0,1 – 0,3 mg/kg telesnej hmotnosti. Maximálna jednotlivá dávka by u dospelých nemala byť vyššia ako 20 mg. Deťom sa odporúča dávka 0,1 – 0,2 mg/kg telesnej hmotnosti. [19]

2.3.4 Farmakokinetické vlastnosti

Nalbufin má po parenterálnom podaní rýchly nástup účinku, 3-5 minút po intravenózne aplikácii a menej ako 15 minút po intramuskulárnej alebo subkutánnej injekcii. Trvanie pôsobenia je od 3 do 6 hodín. Väzba nalbufinu na bielkoviny plazmy je približne 50%. Nalbufin sa metabolizuje v pečeni na sedem metabolitov, ktoré však nie sú farmakodynamicky aktívne. [19] [20].

2.3.5 Indikácie

Nalbufin sa používa v parenterálnej forme na krátkodobé zmiernenie stredne závažnej až závažnej bolesti. Možno ho tiež použiť na predoperačnú a pooperačnú analgéziu. [20]

2.4 Rozličné metódy HPLC stanovenia Nalbufin hydrochloridu v rôznych matriciach

Ako je zrejmé z Tab.1 na stanovenie Nalbufin hydrochloridu sa najčastejšie používa kvapalinová chromatografia. Ako mobilná fáza sa najčastejšie používa acetonitril a metanol v kombinácii s vodným roztokom slabej organickej kyseliny s upraveným pH.

Jedna z vyvinutých a najnovších metód popisuje jednoduché a citlivé stanovenie Nalbufin hydrochloridu z krvných vzoriek. Vzorky boli extrahované etylacetátom. Metóda bola prevedená na HPLC prístroji Shimadzu s elektrochemickým detektorom. Bola využitá RP kolóna Ultrasphere C18; (150 x 4,6 mm; 5,0 μ m), ktorej separácia prebiehala pri konštantnej teplote 30°C. MF bola tvorená zložkami A a B. Separácia prebiehala izokraticky pri zložení 65%A. Zložkou A bol použitý 0,1 M roztok fosforečnanu sodného s upraveným pH na 5,5. Zložkou B bol metanol. Prietok mobilnej fázy bol 1mL/min. Limity kvantifikácie vo vzorkách krvi boli pre Nalbufin hydrochlorid 25 ng/mL. Na základe citlivosti a reprodukovateľnosti je táto metóda vhodná pre farmakokinetické či farmakodynamické štúdie. [29]

V staršej štúdií bola vyvinutá metóda na stanovenie Nalbufin hydrochloridu v plazme človeka. Látka bola extrahovaná s hexán-izoamylalkoholom pri pH 9,25. V HPLC systéme s UV detekciou pri 210 nm bola použitá kolóna mPorasil C18; s rozmermi 300 x 3,9 mm; 10,0 μ m. Mobilnú fázu tvorili dve zložky: A a B. Elúcia prebiehala izokraticky pri zložení 40% A. Zložkou A bol 5 mM roztok octanu sodného, s upraveným pH na 6,6. Zložkou B bol acetonitril. Prietok mobilnej fázy bol 1,2 mL/min. Limit kvantifikácie v krvej plazme bol stanovený na 0,75 ng/mL. Táto metóda, ktorá bola vyvinutá v roku 1996, našla využitie v rozličných farmaceutických laboratóriách pre svoju jednoduchosť, rýchlosť a citlivosť. [30]

Frank de Cazanove, Jean-Marie Kinowski a kol. vo svojej štúdií stanovovali koncentráciu Nalbufinu v krvnej plazme u detí. Bola vyvinutá chromatografická metóda pre vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu. Metóda zahŕňala vyčistenie vzoriek extrakciou kvapalina-kvapalina zmesou chloroform-izopropanol. Po centrifugácii sa organická fáza opäť extrahovala 17 mM kyselinou fosforečnou a až potom bola vodná fáza injektovaná do kolóny. Separácia sa uskutočnila na analytickej kolóne s obrátenými fázami (Ultrasphere ODS, 250 x 4,6mm; 5,0 μ m). Mobilná fáza pozostávala zo zložiek A a B. Zložku A tvoril metanol. Zložkou B bol fosfátový pufr s upraveným pH na 3,4. Izokratická elúcia prebiehala s prietokom 1mL/min a elektrochemickou detekciou. LOQ bol stanovený na hodnotu 0,3 ng/mL a limit detekcie bol 0,1 ng/mL. Opakovateľnosť bola pod 10%. Táto metóda bola validovaná pre koncentrácie v rozmedzí od 1 do 14 ng / mL, čo sa v súčasnosti považuje za klinicky relevantný rozsah pre koncentrácie Nalbufinu v plazme. Tento test je selektívny, spoľahlivý a má dobrú účinnosť.

Súčasná metóda s nízkym limitom kvantifikácie (0,3 ng/mL) je dostatočne rýchla, citlivá a špecifická na stanovenie Nalbufinu vo veľkom počte vzoriek plazmy počas terapeutického monitorovania liekov. [31]

E. Nicolle, S. Michaut a kol. sa vo svojej práci venovali vývoju metódy, ktorá mala byť citlivá, presná a špecifická pre farmakokinetické štúdie Nalbufinu. Ich práca bola zameraná

najmä na monitorovanie liečby u novorodencov a dojčiat narodených z matiek, ktoré boli liečené Nalbufinom. Vyvinutá metóda bola určená pre vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu s coulometrickým detektorom. Ako extrakčné rozpúšťadlá boli zvolené hexán:dichlórmetán:izopropanol v pomere 69:30:1. Týmto spôsobom bola adekvátne odstránená organická vrstva. Metóda bola prevedená na HPLC prístroji Waters s coulometrickým detektorom. Bola využitá RP kolóna I. D. Lichrospher C18; (150 x 4,6 mm; 5,0µm), ktorej separácia prebiehala pri laboratórnej teplote. MF bola tvorená zložkami A a B. Separácia prebiehala izokraticky pri zložení 20% A s prietokom 0,8 mL/min. Zložku A tvoril metanol. Zložku B tvoril vodný roztok, ktorý obsahoval: 24 mM dihydrogénfosforečnanu draselného, 0,06 mM disodnú soľ EDTA. Kyselinou ortofosforečnou bolo upravené výsledné pH na hodnotu 3,4. Limit detekcie (LOD) bol stanovený na 0,1 ng/mL a limit kvantifikácie (LOQ) bol vyhodnotený na hodnotu 0,5 ng/mL.

Vyvinutá metóda dosahuje nízky limit detekcie s vysokou selektivitou a spoľahlivosťou. Táto vlastnosť ju predurčuje k použitiu na farmakokinetické alebo terapeutické účely. [32]

M.A.Quarry, D.S. Sebastian a kol. vo svojej štúdií vyvíjali HPLC metódu a stanovovali množstvo Nalbufinu v injekčnom roztoku Nalbufin hydrochloridu. Separácia prebiehala na chromatografickej kolóne Zorbax SC-C8; (150x4,6 mm; 5,0µm) s obrátenými fázami (RP). Mobilná fáza sa skladala z dvoch zložiek: A a B. Zložku A tvoril 0,05% roztok zložený z kyseliny trifluóroctovej, acetonitrilu a tetrahydrofuránu v pomere 92:5:3. Zložku B tvoril acetonitril. Separácia prebiehala gradientovým typom elúcie s prietokom 2 mL/min v zložení: 100% A prvých 6 minút, potom lineárny gradient od 0% B do 60% B za 10 minút. Podržať na 60% B počas dvoch minút a následný návrat do 100% A. Ekvilibrácia – návrat k pôvodným podmienkam trvala 8 minút pred ďalším nástrekom. Kvantifikácia bola dosiahnutá s UV detekciou pri 280 nm. Vyvinutá metóda bola úspešne použitá na stanovenie Nalbufinu a iných látok obsiahnutých v injekčnom roztoku Nalbufin hydrochloridu. [33]

Jednou z najnovších chromatografických metód pre stanovenie Nalbufin hydrochloridu je metóda, ktorú vyvinuli a validovali vo svojej štúdií A. Attia Khalid a kol. (2014). Bola vyvinutá a zvalidovaná jednoduchá a citlivá metóda pre systém vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Analýza bola uskutočnená na kolóne BDS Hypersil C18 (250 x 4,6mm; 5 µm). Mobilná fáza pozostávala z dvoch zložiek. Zložkou A bol roztok 5 mM octanu sodného, ktorý mal upravené pH na hodnotu 5,5. Zložkou B bol acetonitril. Separácia prebiehala izokraticky pri zložení 40% A s prietokom 1,0 mL/min. Separácia sa uskutočnila pri laboratórnej teplote s UV detekciou pri 210 nm. Metóda ukázala dobrú lineárnosť s detekčným limitom 0,243 a limitom kvantifikácie 0,737 µg/mL. Metóda bola validovaná a úspešne použitá na stanovenie nalbufinu v komerčnom prípravku.

Navrhovaný HPLC postup bol použitý na stanovenie nalbufinu v ampuliach Nalufin®. Získané výsledky boli uspokojivé a v dobrej zhode s tvrdením na štítku výrobcu, čo naznačuje, že rušivé účinky excipientov a aditív by mali byť minimálne.

Vyvinutá metóda je jednoduchá, rýchla, správna a presná. Môže sa použiť na analýzu Nalbufin hydrochloridu v čistej forme a vo forme farmaceutickej dávky.[34]

Tab.1 Podmienky HPLC analýzy **Nalbufin hydrochloridu** v rôznych matriciach

| Matrica | Analyt | Stacionárna fáza | Mobilná fáza | Typ elúcie/prietok | Detekcia | Odkaz |
|---------------------------------|--------------|---|--|-----------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| krvné vzorky | Nalbufin-HCl | Ultrasphere C18; 150 x 4,6 mm; 5,0µm | A: 0,1 M fosforečnan sodný (pH 5,5) B: MeOH | 65% A 1,0 mL/min. | Elektrochemická detekcia | Dorien Groenendaal et al. (2005) [29] |
| plazma | Nalbufin-HCl | mPorasil C18; 300 x 3,9 mm; 10,0µm | A: 5,0 mM octan sodný (pH 6,0) B: ACN | 40% A 1,2 mL/min. | UV; 210 nm | Shung-Tai-Ho et al. (1996) [30] |
| plazma | Nalbufin-HCl | Ultrasphere ODS C18; 250 x 4,6 mm; 5,0µm | A: MeOH B: Fosfátový pufr, pH 3,4 | 20% A 1,0 mL/min. | Elektrochemická detekcia | Frank de Cazanove et al. (1996) [31] |
| plazma | Nalbufin-HCl | I. D. Lichrospher C18; 150 x 4,6 mm; 5,0µm | A: MeOH B: 24 mM KH ₂ PO ₄ + 0,06 mM disodná soľ EDTA, pH 3,4 (upravené kys. ortofosforečnou) | 20% A 0,8 mL/min. | Elektrochemická detekcia | E. Nicolle et al. (1994) [32] |
| injekčný roztok | Nalbufin-HCl | Zorbax SC-C8; 150 x 4,6 mm; 5,0µm | A: 0,05 % roztok; kyselina trifluóroctová : acetonitril : tetrahydrofurán v pomere (92:5:3) B: Acetonitril | Gradient; 2,0 mL/min. | UV; 280 nm | M.A.Quarry et al.(1998) [33] |
| Štandard Nalbufin hydrochloridu | Nalbufin-HCl | BDS Hypersil C18; 250 x 4,6 mm; 5,0µm | A: 5,0 mM octan sodný (pH 5,5) B: ACN | 40% A 1,0 mL/min. | UV; 210 nm | A.Attia Khalid et al.(2014) [34] |

2.5 Validácia analytickej metódy

Validácia je proces prostredníctvom ktorého sa stanovuje vhodnosť použitia daného systému za účelom získania relevantných údajov. Pri procese validácie hodnotíme, nakoľko sú parametre metódy porovnateľné s požiadavkami na analytické výsledky. [35] Hlavným cieľom procesu validácie je posudzovanie analytických znakov metódy a zároveň nadobudnutie dôkazov, že bola dosiahnutá požadovaná miera vymedzených znakov. Môžeme teda povedať, že podstatným cieľom validácie je zabezpečiť, aby pri opakovanom použití v rôznych laboratóriách metóda zaistovala vždy rovnako spoľahlivé výsledky. [36]

Validačný proces zahŕňa špecifikáciu podmienok, ktoré u HPLC systému je potrebné striktné dodržať, aby validácia analytickej metódy bola správna a presná. Validácia obsahuje kontrolu, že stanovené kritériá môžu byť použitím analytickej metódy splnené a platné. [37] Metóda bola validovaná v nasledujúcich parametroch: presnosť, linearita, robustnosť a boli stanovené limity detekcie (LOD) a limity kvantifikácie (LOQ).

2.5.1 Selektivita metódy

Selektivita metódy je zameraná na rozlišovanie medzi analytom, ktorý má byť stanovený a ďalšími zložkami vzorky (matrica). Do matrice možno začleniť nečistoty, metabolity, štiepne produkty a iné. [38]

Signál zodpovedajúci pozorovanému analytu môže byť ovplyvnený tromi spôsobmi:

- a) zvyšuje alebo znižuje citlivosť merania
- b) vybrané zložky matrice prispievajú k analytickému signálu analytu bez ovplyvňovania citlivosti merania. V tejto súvislosti hovoríme o vplyve interferentov.
- c) kombinácia vplyvu matrice a interferentov

Využitím vhodných separačných techník možno minimalizovať vplyv matričných efektov a interferentov. [37]

2.5.2 Správnosť – aritmetický priemer a presnosť – relatívna smerodajná odchýlka

Aritmetický priemer \bar{x} je exaktným odhadom strednej hodnoty. [39]

Relatívna smerodajná odchýlka sa používa na komparáciu smerodajnej odchýlky s priemerom série meraní. Relatívna smerodajná odchýlka vyjadruje smerodajnú odchýlku ako percento z priemeru. [40] Pod smerodajnou odchýlkou sa rozumie miera presnosti výsledkov stanovení. Hodnota smerodajnej odchýlky vyjadruje rozptýlenie jednotlivých hodnôt x_i okolo priemeru \bar{x} .

Relatívnu smerodajnú odchýlku možno vymedziť ako zhodu medzi opakovanými meraniami rovnakej vzorky. Ide o mieru náhodnej chyby, ktorá je vyjadrená ako percentuálny koeficient rozptylu, alebo sa označuje ako relatívna štandardná odchýlka (RSD) opakovaného merania.

2.5.3 Pracovný rozsah

Pracovný rozsah je interval hodnôt koncentrácií alebo obsahov, úzko súvisí s tvarom závislosti analytického signálu na koncentráciu analytu v širšom intervale koncentrácií (obsahov). [37]

2.5.4 Linearita

Linearita analytickej metódy sa označuje schopnosť nadobudnúť výsledky testov, ktoré sú priamo úmerné koncentráciám stanovovaných látok vo vzorke.[40]

Regresnou závislosťou sa rozumie vzťah závislej premennej, zvyčajne určovanej meraním k nezávislej premennej, ktorej hodnoty sú známe. Ak je hodnota závislej a nezávislej premennej určovaná meraním, ich vzťah sa nazýva korelácia. [41]

Lineárna regresná závislosť je vyjadrená vzťahom:

$$y = a + bx$$

a- úsek posunutia

b- smernica kalibračnej priamky

Korelačný koeficient – R charakterizuje tesnosť vzájomnej závislosti dvoch náhodných premenných. Nadobúda hodnoty + 1 a čím sa viac približuje k hodnote jedna, tým je závislosť oboch náhodných premenných tesnejšia. Hodnota 0,98 je pre korelačný koeficient limitná. [42]

Pre hodnotenie stupňa závislosti používame koeficient determinácie R^2 , ktorý vyjadruje podiel spoločnej variability medzi dvoma premennými. [43]

Počet vzoriek známeho obsahu x_i sa odčíta prislúchajúca intenzita signálu y_i , následne pre každú z nameraných hodnôt sa vypočíta odchýlka od priemeru $Y_i = y_i - \bar{y}$ a $X_i = x_i - \bar{x}$, a kde \bar{y} je priemer hodnoty y_i a \bar{x} je priemer hodnoty x_i . Akceptovateľná hodnota korelačného koeficientu nesmie klesnúť pod hodnotu 0,98. [44]

Kalibračná krivka je krivka vyjadrujúca vzťah medzi koncentráciou analytu vo vzorke a nameraným údajom. Kalibračnú krivku možno zostaviť na základe namerania adekvátneho množstva štandardov (5-8), tak aby bolo možné zabezpečiť reprodukovateľnú závislosť. Je relevantné používať kalibračné krivky pokrývajúce celý rozsah koncentrácií neznámych vzoriek. [45]

2.5.5 Robustnosť

Je charakterizovaná ako miera schopnosti metódy zostať nedotknutá malými, ale zámernými odchýlkami v parametroch metódy. Taktiež poskytuje údaj o spoľahlivosti metódy pri normálnom používaní.

Robustnosť preukazuje tesnosť zhody medzi získanými výsledkami Meranie je realizované za rôznych podmienok. [35]

2.5.6 Medza detekcie a kvantifikácie

Medza detekcie vyjadruje koncentráciu, pre ktorú je analytický signál štatisticky signifikantne odlišný od šumu a vyjadruje sa ako trojnásobok šumu základnej línie. Typický signál (šum) je meraný od základnej línie po vrchol pílu.

LOD (limit detekcie) analytu je vo všeobecnosti najnižšie množstvo analytu vo vzorke, ktoré sme schopní detekovať, ale ktoré nie je nutné kvantifikovateľné ako exaktná hodnota. Vypočítame ho podľa vzťahu (9):

$$LOD = 3,3 \cdot \sigma / S \quad (9)$$

σ je smerodajná odchýlka odozvy

S je smernica kalibračnej krivky

LOQ (limit kvantifikácie) je najnižšia koncentrácia analytu, ktorá môže byť stanovená s prijateľnou mierou správnosti a presnosti.[40] Medza stanoviteľnosti zodpovedá koncentrácii v rámci ktorej presnosť stanovenia umožňuje kvantitatívne vyhodnotenie a vyjadruje sa ako desať násobok šumu základnej línie. [46]Vypočítame ho podľa vzťahu (10):

$$LOQ = 10 \cdot \sigma / S \quad (10)$$

σ je smerodajná odchýlka odozvy

S je smernica kalibračnej krivky

3 CIELE PRÁCE

Počet prác ktoré sa zaoberajú HPLC analýzou Nalbufin hydrochloridu je doposiaľ nízky. Z tohto dôvodu cieľom predloženej diplomovej práce je vývoj a validácia analytickej metódy pre hodnotenie čistoty aktívnej farmaceutickej substancie Nalbufin hydrochloridu metódami kvapalinovej chromatografie.

Nalbufin hydrochlorid je semisyntetický opioidný agonista-antagonista zo skupiny morfinanov. Indikuje sa na zmiernenie strednej až ťažkej pooperačnej či popôrodnej bolesti. Vystupuje ako analgetikum pod rôznymi obchodnými názvami ako sú: Nubain, Nalbin, Analin a iné.

Na dosiahnutie tohto cieľa boli zvolené nasledovné prístupy:

- spracovať literárny prehľad o možnostiach stanovenia Nalbufin hydrochloridu kvapalinovou chromatografiou
- vyvinúť chromatografickú metódu pre stanovenie Nalbufin hydrochloridu, Oxykodónu a Noroxykodónu v jednej analýze s použitím systému RP-HPLC a DAD detekciou
- validovať metódu pre rutinné použitie a zabezpečiť, aby spĺňala základné validačné parametre

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Materiál a metódy

4.1.1 Prístroje a zariadenia

Kvapalinový chromatograf bol zostavený z týchto častí:

Čerpadlo:Dionex UltiMate 3000 RS Pump

Detektor:Dionex UltiMate 3000 RS Diode Array Detector

Dávkovacie zariadenie:Dionex UltiMate 3000 RS Autosampler

Termostat:Dionex UltiMate 3000 RS Column Compartment

Software: Empower 3, WATERS

Ultrazvukový kúpeľ:Sonorex Super 10P, Bandelin

Prístroj pre ultračistú vodu:Millipore Milli-Q Gradient A-10

Váhy: Mettler Toledo XS205

pH meter:WTW inoLab pH7310

Počas experimentov boli použité viaceré typy kolón:

- Symmetry Shield C18; 150 x 4,6mm; 5µm
- Lichrospher RP60 SelectB; 125 x 4,0mm; 5µm
- Eclipse XDB-C8; 150 x 4,6mm; 3,5µm
- Luna C8; 150 x 4,6mm; 5µm
- Luna Phenyl-hexyl; 75 x 4,6mm; 3µm
- Nova-Pak C8; 250 x 4,6mm; 4µm

4.1.2 Chemikálie

- Oktansulfonát sodný, Fisher (1560807)
- Hexansulfonát sodný, Merck (K44186005308)
- Kyselina fosforečná, Merck (K47168363542)
- Hydroxid sodný, Sigma Aldrich (71690500-6)
- Acetonitril, Merck (10890930722)
- Metanol, Merck (I0887607718)
- Tetrahydrofurán, Merck (1814201604)
- Triethylamín, Acros (A0380808)
- Octan sodný, Mikrochem (A152380)
- Kyselina octová, Mikrochem (MK44279256308)
- Ultračistá voda

4.1.3 Testované látky

JG-01415-17K1 - Oxykodón

JG-026-17 - Noroxykodón

JG-033-17 – Nalbufin hydrochlorid

4.1.4 Príprava testovaných roztokov

- I. Navážili sme si 20,03 mg Nalbufin hydrochloridu, ktorý sme rozpustili v 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkovej a doplnili do objemu 10 mL odmernej banky. Výsledná koncentrácia bola 2 mg/mL.
- II. Navážili sme si 2,02 mg Oxykodónu, ktorý sme rozpustili v 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkovej a doplnili do objemu 10 mL odmernej banky (zásobný roztok). Vzorka bola ešte 10x zriedená roztokom kyseliny chlorovodíkovej (odobraté 1 mL zo zásobného roztoku Oxykodónu a doplnenie do objemu 10 mL).. Výsledná koncentrácia teda bola 0,02 mg/mL.
- III. Navážili sme si 2,04 mg Noroxykodónu, ktorý sme rozpustili v 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkovej a doplnili do objemu 10 mL odmernej banky (zásobný roztok). Vzorka bola ešte 10x zriedená 0,1M roztokom kyseliny chlorovodíkovej (odobraté 1 mL zo zásobného roztoku Noroxykodónu a doplnenie do objemu 10 mL). Výsledná koncentrácia teda bola 0,02 mg/mL.

4.2 Vývoj metódy

S vývojom metódy súviseli testy viacerých možných postupov na detekciu Nalbufin hydrochloridu a nečistôt Oxykodónu a Noroxykodónu. Bolo testovaných šesť chromatografických kolón, niekoľko mobilných fáz, rôzne gradienty (izokratické elúcie) MF počas separácie.

4.2.1 Mobilná fáza

Testované boli viaceré mobilné fázy:

- Špecifikácia podľa PhEur Naltrexon hydrochlorid (oktansulfonát sodný - 1,1 g/L, pH 2,3 : ACN)
- Špecifikácia podľa PhEur Naloxone hydrochloride dihydrate (MFA – ACN:THF:Roztok A (1,1 g/L) v pomere 2:4:94; MFB – THF:ACN:Roztok A (1,1 g/L) v pomere 4:17:79)
- Oktansulfonát sodný (1,1 g/L) pH 2,3 : ACN
- Oktansulfonát sodný (1,1 g/L) pH 5,5; TEA : ACN
- Hexansulfonát sodný (0,93 g/L), voda, MeOH, TEA, H₃PO₄; pH 2,5
- Oktansulfonát sodný (1,1 g/L), voda, ACN, TEA; pH 2,5
- MFA – oktansulfonát sodný (1,1 g/L), voda, ACN, TEA; pH 2,5 (90:10), MFB – oktansulfonát sodný (1,1 g/L), voda, ACN, TEA; pH 2,5 (80:20)

4.2.2 Chromatografické podmienky

Pri vývoji metódy sme začínali výberom najvhodnejšej kolóny a úpravou podmienok stanovenia ako zloženie MF, teplota a rýchlosti prietoku tak aby prišlo k selekcii Oxykodónu, Noroxykodónu a Nalbufinu.

Cieľom vývoja bola separácia troch píkav až na základnú líniu s ohľadom na veľkosť, symetriu jednotlivých píkav a zachovanie vhodných chromatografických podmienok.

Následne sme vyvinutú metódu validovali podľa platných podmienok štandardného operačného postupu „Validácia analytických metód“ (SOP-05390) spoločnosti Saneca pharmaceuticals.

Nakoľko Naltrexon a Naloxon sú štruktúrne veľmi podobné látky Nalbufinu (Obrázok 5, Obrázok 6, Obrázok 7), otestovali sme ich liekopisné chromatografické metódy (podmienky) pre HPLC čistotu Nalbufinu.

Medzi prvými boli testované chromatografické metódy podľa špecifikácie PhEur pre Naltrexon a Naloxon hydrochlorid. Výsledkom týchto analýz bola identifikácia medziproduktov, ktoré vznikajú v procese výroby ako známe nečistoty. V Tabuľke 2 uvádzame identifikáciu medziproduktov s ich retenčnými (RT) a relatívnymi retenčnými časmi (RRT).

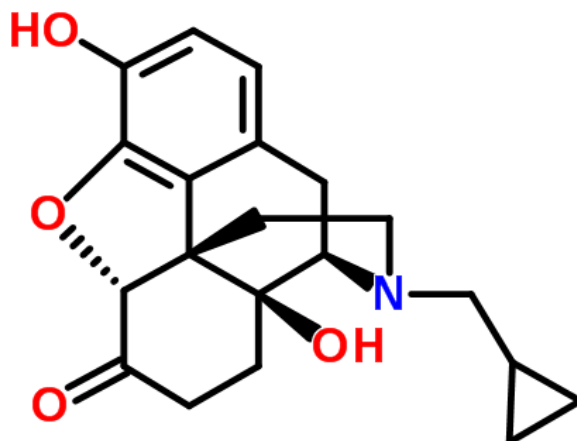
Tab.2 Testované podmienky HPLC analýzy čistoty Nalbufin hydrochloridu

Nalbufin - identifikácia medziproduktov

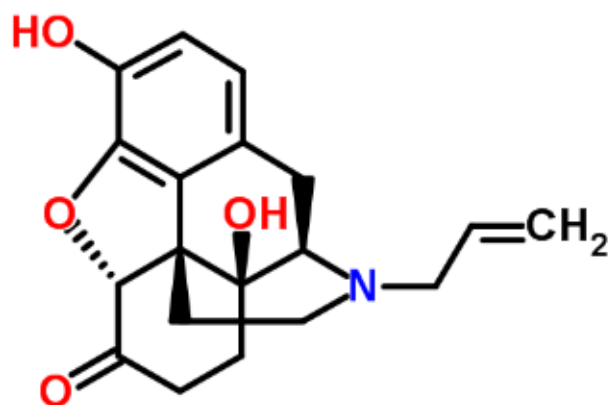
| metóda Naltrexon Hydrochlorid Ph. Eur. | | |
|--|-------|------|
| | RT | RRT |
| 3-metoxynalbufin | 23,6 | 1,29 |
| Nalbufon | 19,7 | 1,08 |
| Noroxykodón | 17,18 | 0,94 |
| Oxykodón karbamát | 26,71 | 1,46 |
| Oxykodón | 16,63 | 0,91 |
| Nalbufin | 18,3 | |
| metóda Naloxon Hydrochlorid Ph. Eur. | | |
| | RT | RRT |
| 3-metoxynalbufin | 35,2 | 1,58 |
| Nalbufon | 26,1 | 1,17 |
| Noroxykodón | 21,1 | 0,95 |
| Oxykodónkarbamát | 35,6 | 1,60 |
| Oxykodón | 18,1 | 0,81 |
| Nalbufin | 22,3 | |

Následne boli testované viaceré zloženia mobilných fáz s rozličnými podmienkami separácie (zmena pH, teploty, typ elúcie) no žiadna z nich nevyhovovala požadovaným vlastnostiam.

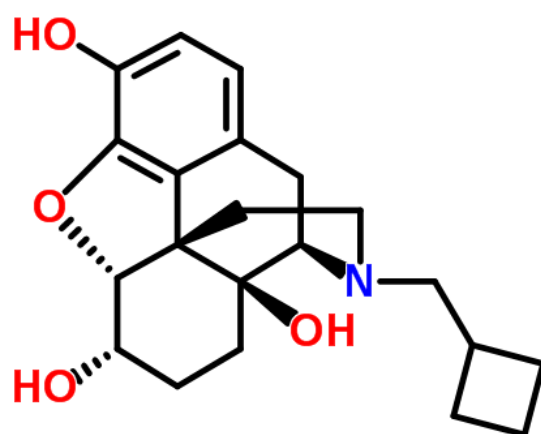
Pri separácii na C18 kolóne sme použili mobilnú fázu, ktorá sa preukázala ako najvhodnejšia a pozostávala z dvoch zložiek A a B. Mobilná fáza v spojení s kolónou Nova-Pak C18 nám poskytla dostačujúce rozlíšenie analytov a s ohľadom na vnútorný priemer kolóny sa zlepšil pomer signál/šum v nízkych koncentráciách. Ako zložka A bol zvolený vodný roztok modifikátora ako rozpúšťadla s menším podielom acetonitrilu. Zloženie MF A bolo nasledujúce: 0,97 g oktansulfonátu sodného sa rozpustilo v 900 mL vody ku ktorej sa pridalo 100 mL acetonitrilu a 2 mL trietylamínu. Vzniknutý roztok bol upravený kyselinou fosforečnou na výsledné pH 2,5. Zložkou B bol vodný roztok modifikátora s väčším podielom ACN. MF B mala nasledujúce zloženie: 0,86 g oktansulfonátu sodného sa rozpustilo v 800 mL vody ku ktorej sa pridalo 200 mL acetonitrilu a 2 mL TEA. Výsledné pH bolo upravené kyselinou fosforečnou na 2,5. Gradient MF bol upravený tak, aby bolo dosiahnuté dostatočné rozlíšenie Nalbufínu, Oxykodónu a Noroxykodónu. Od nulte minúty zo 100 %A do 30 min. na 0 %A. V 30-60 min. 0 %A, 60-61 min. s lineárnou zmenou na 100 %A, 61-70 min. ekvilibrácia do pôvodných podmienok na 100 %A pri prietoku 1 mL/min. Pre ideálny chromatografický pík, ktorý má Gaussovský profil sa bolo nutné vyhnúť dvom najvýraznejším asymetriám: „frontovanie“ a chvostovanie „tailing.“ Prvá zmienená asymetria býva najčastejšie dôsledkom preťaženia kolóny vzorkou. Druhá menovaná asymetria býva spôsobená, ak niektoré miesta stacionárnej fázy zachytávajú stanovenú látku silnejšie ako iné. Ako kompenzáciu sme sa snažili vyvážiť gradient mobilnej fázy, prietokovú rýchlosť a jej pH. Pre ekvilibráciu kolóny medzi jednotlivými stanoveniami je vhodné spúšťať ďalšiu analýzu v 10 minútových intervaloch. Dávkovaný objem vzorky autosamplerom bol po celú dobu analýzy 10 µl.



Obrázok 5: Základná štruktúra Naltrexonu (prevzaté z [47])



Obrázok 6: Základná štruktúra Naloxonu (prevzaté z [48])



Obrázok 7: Základná štruktúra Nalbufinu (prevzaté z [49])

4.2.3 HPLC analýza

K vývoju chromatografickej metódy boli merané testovacie vzorky. Analýza s následným vyhodnotením prebehla i pre jednotlivé roztoky štandardov. Výsledné parametre HPLC systému po vývoji metódy pre hodnotenie čistoty Nalbufin hydrochloridu sú:

Prípravok: Nalbufin hydrochlorid

Špecifikácia: N/A

Zariadenie: Dionex Ultimate 3000

Kolóna: Nova Pak C18 150x3,9mm, 4μm

Mobilná fáza: MF A: 0,97 g oktansulfonát sodný do 900 mL H₂O + 100 mL ACN + 2 mL TEA, úprava pH = 2,5 s H₃PO₄

MF B: 0,86 g oktansulfonát sodný do 800 mL H₂O + 200 mL ACN + 2 mL TEA, úprava pH = 2,5 s H₃PO₄

Priebeh gradientu:

| t | %A | %B |
|-------|-------|-------|
| 0-30 | 100-0 | 0-100 |
| 30-60 | 0 | 100 |
| 60-61 | 0-100 | 100-0 |
| 61-70 | 100 | 0 |

Prietok: 1,0 mL/min.

Nástrek: 10 mL

Teplota kolóny: 50°C

Teplota autosampleru: lab.

Detekcia: UV 206nm

4.3 Validácia metódy

Analytické metódy, ktoré sú používané pre monitorovanie kvality liečiv musia byť vhodné, presné a spoľahlivé.

Validácia analytickej metódy je séria experimentov, ktorými sa zistia najdôležitejšie charakteristiky metódy. Cieľom validácie je zabezpečiť, aby pri opakovanom použití v rozličných laboratóriách metóda zabezpečovala rovnako spoľahlivé výsledky. U metód, ktoré sa týkajú vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie je nutné dbať na dodržanie analytických parametrov, nakoľko sú dôležité pre validáciu chromatografickej metódy. Metóda bola validovaná v nasledujúcich parametroch: presnosť, linearita, robustnosť. Taktiež boli stanovené limity detekcie (LOD) a limity kvantifikácie (LOQ) s opakovateľnosťou pri stanovení LOQ.

Tab.3 Doporučené limity jednotlivých validačných parametrov

| Validačný parameter | Jednotky/vyjadrenie | Doporučené limity |
|---------------------------|--------------------------|--------------------|
| presnosť (opakovateľnosť) | [% RSD] | $RSD \leq 5,0\%$ |
| linearita | korelačný koeficient | $R^2 > 0,9990$ |
| linearita | graficky rovnica priamky | - |
| LOD | [% , $\mu\text{g/mL}$] | - |
| LOQ | [% , $\mu\text{g/mL}$] | $LOQ \leq 0,02 \%$ |
| LOQ - opakovateľnosť | [% RSD] | $RSD \leq 7,0 \%$ |

4.3.1 Príprava zásobných roztokov štandardov

- Príprava zásobného roztoku Nalbufinu

Navážili sme si 20,03 mg Nalbufinu, ktorý sme rozpustili v 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkovej a doplnili do objemu 10 mL odmernej banky. Z tohto roztoku sme vytvorili zásobný roztok odpipetovaním 2 mL, ktoré sme preniesli do 100 mL odmernej banky a doplnili do tohto objemu 0,1M roztokom kyseliny chlorovodíkovej. Výsledná koncentrácia zásobného roztoku Nalbufinu bola 40,06 $\mu\text{g/mL}$.

- Príprava zásobného roztoku Oxykodónu

Navážili sme si 20,32 mg Oxykodónu, ktorý sme rozpustili v 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkovej a doplnili do objemu 10 mL odmernej banky. Z tohto roztoku sme vytvorili zásobný roztok odpipetovaním 2 mL, ktoré sme preniesli do 100 mL odmernej banky a doplnili do tohto objemu 0,1M roztokom kyseliny chlorovodíkovej. Výsledná koncentrácia zásobného roztoku Oxykodónu bola 40,64 $\mu\text{g/mL}$.

- Príprava zásobného roztoku Noroxykodónu

Navážili sme si 20,10 mg Noroxykodónu, ktorý sme rozpustili v 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkovej a doplnili do objemu 10 mL odmernej banky. Z tohto roztoku sme vytvorili zásobný roztok odpipetovaním 2 mL, ktoré sme preniesli do 100 mL odmernej banky a doplnili do tohto objemu 0,1M roztokom kyseliny chlorovodíkovej. Výsledná koncentrácia zásobného roztoku Noroxykodónu bola 40,20 $\mu\text{g/mL}$.

4.3.2 Presnosť

Pre stanovenie presnosti bol použitý štandard Nalbufin hydrochloridu.

Presnosť (precision) analytickej metódy je miera zhody medzi jednotlivými výsledkami merania a prijatou referenčnou hodnotou. Pri stanovení opakovateľnosti (repeatability) sa metóda analyzuje jedným analytikom, na rovnakom prístroji s rovnakými činidlami. Opakovateľnosť podáva informáciu o variabilite nameraných výsledkov. Vyjadrujeme ju ako relatívnu smerodajnú odchýlku (%) šiestich stanovení podľa predpísaného postupu. V neposlednom rade je pri presnosti popisovaná i reprodukovateľnosť, ktorou sa vyjadruje zhoda medzi jednotlivými laboratóriami. Tento parameter nebol v našom projekte hodnotený.

4.3.3 Linearita

Pod pojmom linearita rozumieme priamkovú závislosť medzi dvoma náhodnými premennými. Jedná sa o vzájomnú spojitosť medzi odozvou inštrumentácie (analytický signál) a koncentráciou analytu. Ďalším parametrom je rozsah. Ide o interval medzi dvoma hladinami koncentrácie stanovovanej látky (vrátane týchto hladín), v ktorom je látka stanovená s takou presnosťou, správnosťou a linearitou, ako dokladajú výsledky validácie. Rozsah sa bežne vyjadruje v rovnakých jednotkách ako výsledky analýzy (najčastejšie %). Potvrdenie linearity požadujeme v rozmedzí 10% až 150%. Linearita analytickej metódy sa dokazuje jednak graficky ako závislosť výsledkov na koncentrácií stanovenej látky a jednak matematicky pomocou výsledkov lineárnej regresie (smernica a úsek priamky). Uvádza sa korelačný koeficient (R^2), ktorý je mierou linearity.

Po vývoji chromatografickej metódy s dostatočným rozlíšením pri danej vlnovej dĺžke boli pre požadované štandardy stanovené retenčné časy. Následne boli roztoky štandardov nariadené tak, aby mohli byť použité pre vytvorenie kalibračnej krivky v koncentračnom rozsahu 0,02% - 0,30%. Pripravených bolo 7 pracovných roztokov o rozdielnej koncentracii. Príslušný kalibračný rad bol zostavený jednotlivým riedením zo zásobného roztoku príslušného štandardu. Na riedenie bol použitý roztok 0,1M kyseliny chlorovodíkovej. Závislosť priemerných plôch pík roztokov na ich koncentracii bola vyhodnotená metódou lineárnej regresie. Kalibračná krivka bola zostavená zo siedmych bodov. Linearita bola stanovená pre štandardy uvedených analytov: Nalbufin hydrochlorid, nečistota – Oxykodón a nečistota – Noroxykodón.

4.3.4 Limit detekcie – LOD, limit kvantifikácie – LOQ s opakovateľnosťou stanovenia

Detekčný limit, alebo tiež medza detekcie (LOD) je najmenšie množstvo analytu vo vzorke, ktoré môže byť detekovateľné, nutne nemusí byť kvantifikované ako exaktná hodnota. U inštrumentálnych metód sa detekčný limit zisťuje na základe šumu pozadia systému. Metóda je založená na stanovení smernice kalibračnej priamky a smerodajnej odchýlky odozvy detektora.

Limit kvantifikácie (LOQ) je najnižšia koncentrácia látky stanoviteľná s prijateľnou presnosťou a správnosťou. Tento parameter sa používa u nízkych hladín látok vo vzorkách alebo pri stanovení obsahu nečistôt. Najčastejšie sa vyjadruje ako koncentrácia (v miligramoch na liter, % a pod.). Metóda je založená na stanovení smernice kalibračnej priamky a smerodajnej odchýlky odozvy detektora.

LOD a LOQ bol stanovený pre štandardy jednotlivých analytov (Oxykodón, Noroxykodón a Nalbufin).

Štandardne sa pre výjadrenie LOD a LOQ používa vzťah pre výpočet na základe smerodajnej odchýlky odozvy a smernice. Vypočítané boli pomocou regresnej analýzy.

$$\text{LOD} = \frac{3,3 * \sigma}{S}, \text{ kde}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 * \sigma}{S}, \text{ kde}$$

σ je smerodajná odchýlka odozvy

S je smernica kalibračnej krivky

4.3.5 Robustnosť

Je definovaná ako miera schopnosti metódy zostať nedotknutá malými, ale zámernými odchýlkami v parametroch chromatografickej metódy. Robustnosť poskytuje údaj o spoľahlivosti chromatografickej metódy pri bežnom používaní. Sledovaný bol vplyv zmeny pH (2,4; 2,6) a vplyv teploty kolóny počas analýzy (45°C)

4.3.6 Vyhodnotenie, výpočty a chromatogramy

Namerané plochy a výšky píkov spolu so všetkými potrebnými výpočtami boli spracované pomocou štatistických funkcií v programe Microsoft Excel 2016.

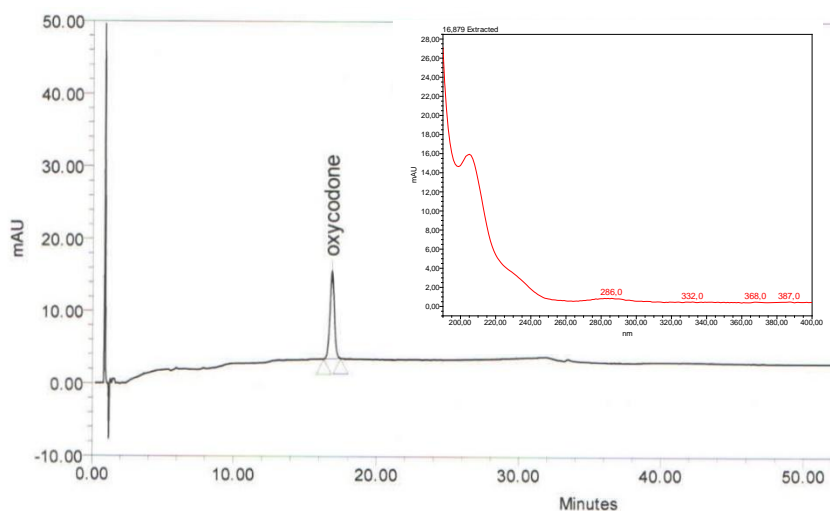
4.4 Výsledky a diskusia

V nasledujúcej časti diplomovej práce sú uvedené výsledky, ktoré boli získané počas vývoja a validácie chromatografickej metódy pre hodnotenie čistoty Nalbufinu. Samotný vývoj metódy pre HPLC stanovenie prebiehal od júna do novembra 2017.

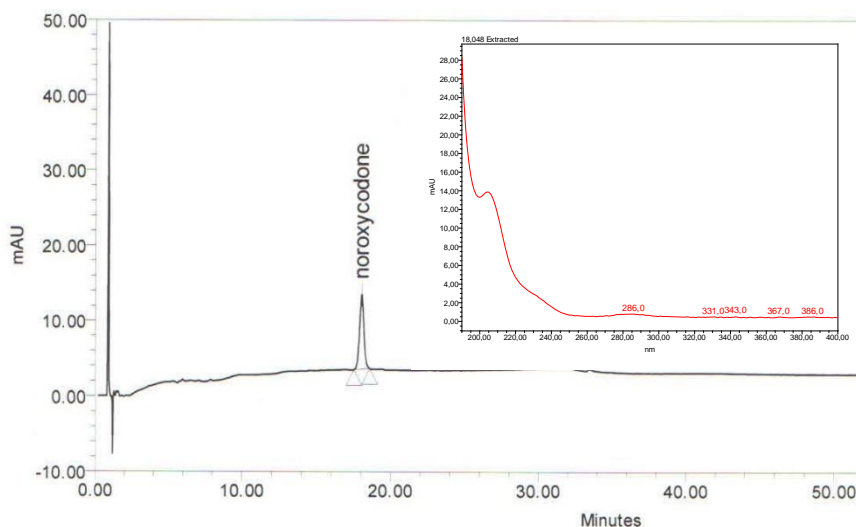
4.4.1 Vývoj metódy

4.4.1.1 UV spektrum – Oxykodón, Noroxykodón a Nalbufin

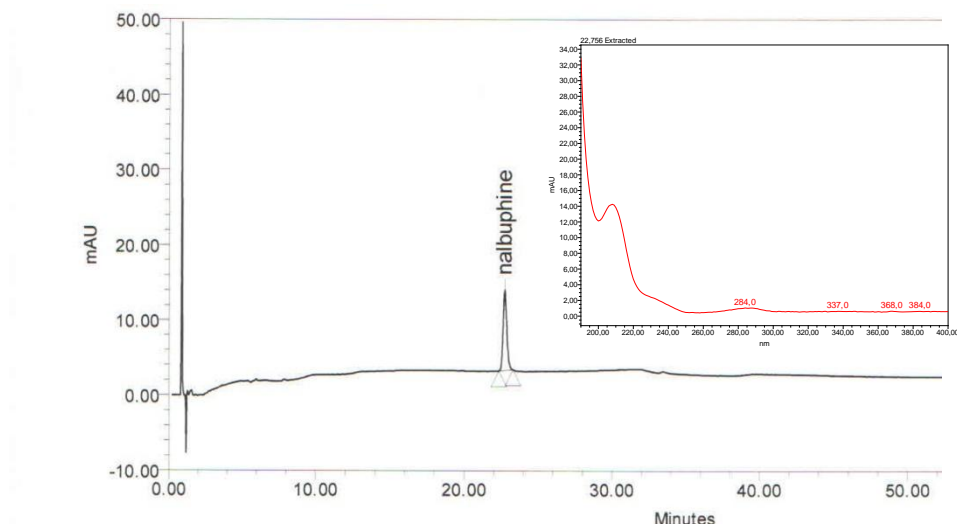
Na Obrázku 8, 9 a 10 sú znázornené chromatogramy s ich UV spektrami Oxykodónu, Noroxykodónu a Nalbufinu. Spektrá boli namerané pri koncentrácii 4,5 µg/mL v 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkovej v rozsahu vlnovej dĺžky 190-400 nm. Meranie prebehlo na HPLC prístroji za použitia detektora s diódovým poľom. Citlivosť detekcie spektrofotometrického detektora závisí podľa Lambert-Beerovho zákona od mólového absorpčného koeficientu danej látky. Preto je vhodné vybrať takú vlnovú dĺžku, pri ktorej je mólový absorpčný koeficient a teda aj citlivosť maximálna. V našom prípade sme na detekciu vybrali vlnovú dĺžku 206 nm. Pri vyššie uvedených chromatografických podmienkach boli retenčné časy Oxykodónu 16,87 min., Noroxykodónu 18,05 min. a Nalbufinu 22,75 min.



Obrázok 8: Chromatogram Oxykodónu a jeho absorpčného spektra a závislého na vlnovej dĺžke



Obrázok 9: Chromatogram Noroxykodónu a jeho absorpčného spektra závislého na vlnovej dĺžke



Obrázok 10: Chromatogram Nalbufinu a jeho absorpčné spektrum závislé na vlnovej dĺžke

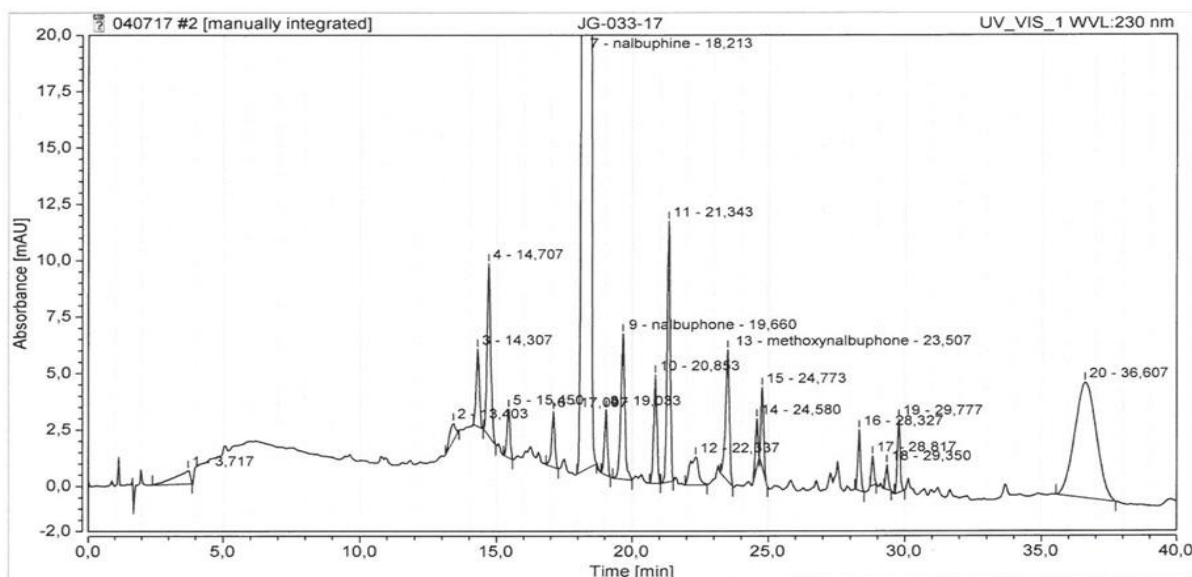
4.4.1.2 Testované chromatografické podmienky separácie

Pri vývoji metódy sme začali výberom najvhodnejšej kolóny a úpravou podmienok stanovenia ako zloženie MF, teplota, rýchlosť prietoku a detekcia tak, aby prišlo k selekcii Nalbufinu a nečistôt Oxykodón a Noroxykodón.

Ako prvá bola testovaná liekopisná metóda podľa špecifikácie PhEur Naltrexon hydrochlorid. Táto metóda bola zvolená ako primárna kvôli štruktúrnej podobnosti Naltrexonu a Nalbufinu. V Tab.4 prinášame podrobnú špecifikáciu metódy. Pri testovaní zvolených podmienok sa ako jediný vhodný pík na analýzu eluoval pík Nalbufinu ako môžeme vidieť na Obrázku 11. Môžeme teda konštatovať, že metóda TP I nie je vhodná pre použitie. Separácia jednotlivých analytov prebehla nedostatočne.

Tab.4 Testované chromatografické podmienky a výsledky I – TP I

| | | | |
|-----------------------|--|-------|-------|
| Prípravok: | Nalbufin hydrochlorid | | |
| Špecifikácia: | podľa PhEur Naltrexon hydrochlorid | | |
| Zariadenie: | Dionex Ultimate 3000 | | |
| Kolóna: | Symmetry Shield C18 150x4,6mm; 5µm | | |
| Mobilná fáza: | MF A: 1,1 g oktansulfonát sodný do 1000 ml vody, pH = 2,3 s H ₃ PO ₄ | | |
| | MF B: Acetonitril | | |
| | t | %A | %B |
| | 0-45 | 90-55 | 10-45 |
| | 45-47 | 55-90 | 45-10 |
| | 47-55 | 90 | 10 |
| Prietok: | 1,2 mL/min | | |
| Nástrek: | 10 µL | | |
| Teplota kolóny: | 40°C | | |
| Teplota autosamplera: | 15°C | | |
| Detekcia: | UV 230nm | | |

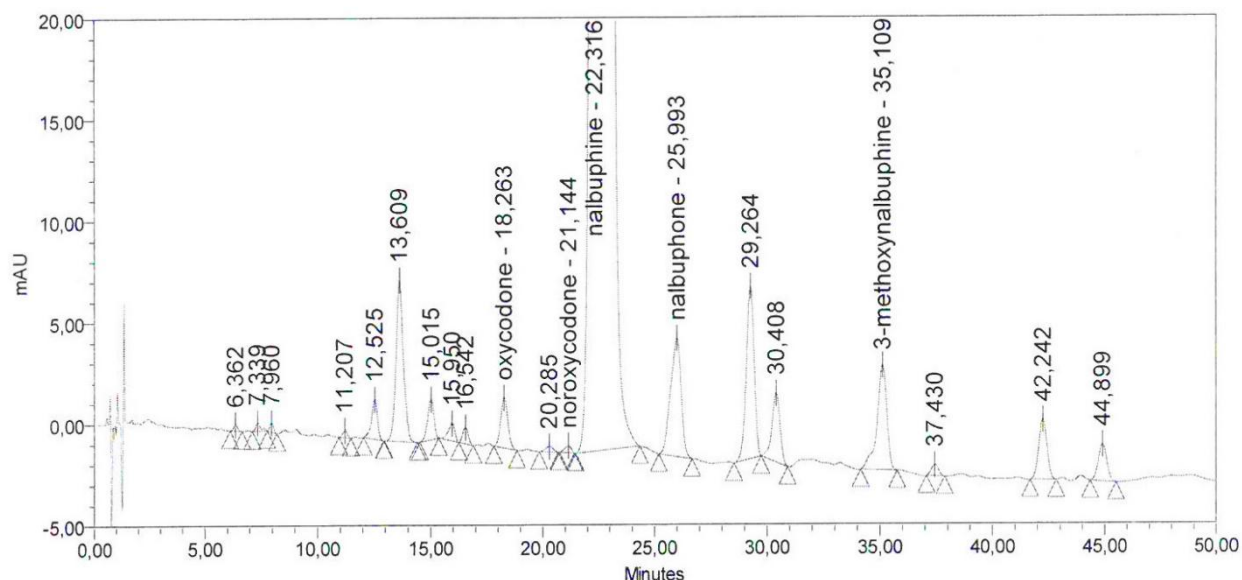


Obrázok 11: Výsledný chromatogram pri použití TP I

Ďalšou testovanou analýzou bola liekopisná metóda podľa špecifikácie PhEur. Naloxon hydrochlorid dihydrát. V Tab.5 podrobne uvádzame podmienky separácie. Táto metóda bola zvolená ako sekundárna kvôli štruktúrnej podobnosti Naloxonu a Nalbufinu. Pri testovaní týchto chromatografických podmienok sme vďaka selektivite a uspokojivým retenčným časom identifikovali medziprodukty Nalbufinu, ktoré uvádzame v Tab.2 (viď kapitola 4.2.2). Na Obrázku 12 je zaznamenaný výsledný chromatogram separácie. Ako je zrejmé zo záznamu ani v tomto prípade neprišlo k dostatočnej separácii Oxykodónu a Noroxykodónu.

Tab.5 Testované chromatografické podmienky a výsledky II – TP II

| | | | |
|-----------------------|--|-------|-------|
| Prípravok: | Nalbufin hydrochlorid | | |
| Špecifikácia: | podľa PhEur Naloxon hydrochlorid dihydrát | | |
| Zariadenie: | LC 2010 Shimadzu | | |
| Kolóna: | Lichrosphere RP60 SelectB 125x4mm; 5µm | | |
| Mobilná fáza: | Roztok A: 4,4 g oktansulfonát sodný do 4000 ml vody, pH = 2,0 s H ₃ PO ₄ | | |
| | MF A: ACN : THF : Roztok A (2:4:94) | | |
| | MF B: THF : ACN : Roztok A (4:17:79) | | |
| | t | % A | % B |
| | 0-40 | 100-0 | 0-100 |
| Prietok: | 40-50 | 0 | 100 |
| | 1,5 mL/min | | |
| Nástrek: | 20 µL | | |
| Teplota kolóny: | 40°C | | |
| Teplota autosampleru: | 15°C | | |
| Detekcia: | UV 230nm | | |

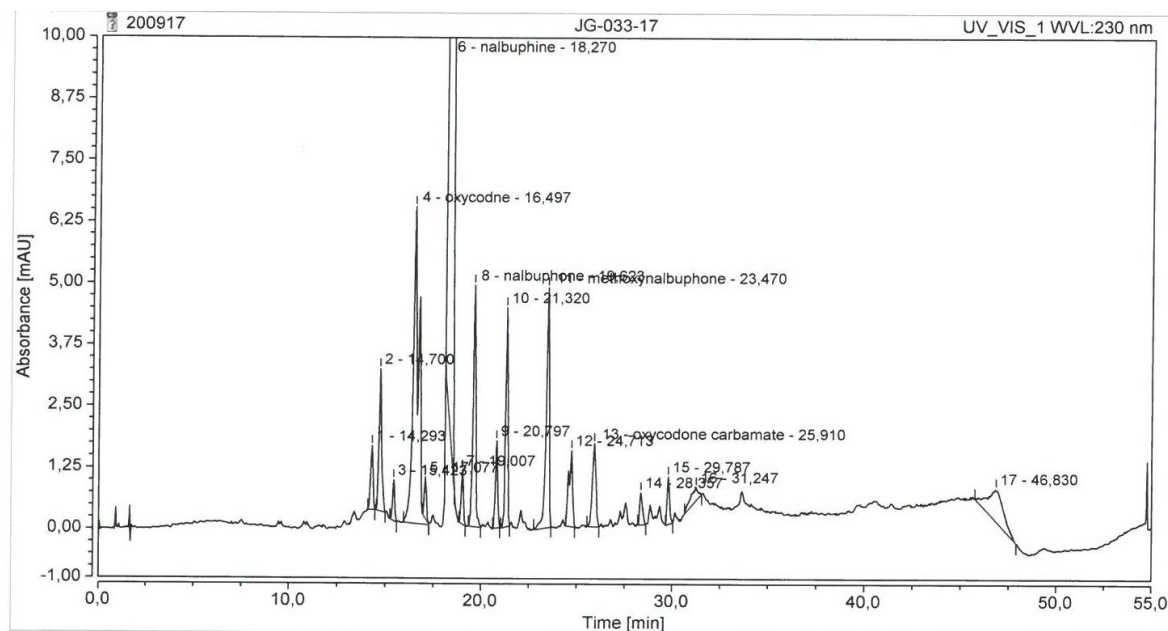


Obrázok 12: Výsledný chromatogram pri použití TP II

Pri separácii na C18 kolóne Symmetry Shield sme použili mobilné fázy, ktoré pozostávali z dvoch zložiek A a B. Ako zložka A boli zvolené vodné roztoky modifikátorov ako rozpúšťadiel s menšou elučnou silou. V tomto prípade bol použitý roztok oktansulfonátu sodného s pH = 2,3 upravený kyselinou orto-fosforečnou. Zložkou B (rozpúšťadlo s väčšou elučnou silou) bol čistý acetonitril. Upravený bol gradient elúcie a zmenená bola i kolóna. Podrobnejšie a úplné chromatografické charakteristiky danej metódy uvádzame v Tab.6. Ako môžeme vidieť zo záznamu chromatogramu na Obrázku 13, separácia Oxykodónu a Noroxykodónu nebola dostatočná. Ďalej sme pozorovali mierne rozširovanie spolu s frontujúcim tvarom píkov.

Tab.6 Testované chromatografické podmienky a výsledky III – TP III

| | | | |
|-----------------------|--|----|----|
| Prípravok: | Nalbufin hydrochlorid | | |
| Špecifikácia: | N/A | | |
| Zariadenie: | Dionex Ultimate 3000 | | |
| Kolóna: | Symmetry Shield C18 150x4,6mm; 5µm | | |
| Mobilná fáza: | MF A: 2,2 g oktansulfonát sodný do 2000 ml vody, pH = 2,3 s H ₃ PO ₄ | | |
| | MF B: Acetonitril | | |
| | t | %A | %B |
| | 0 | 90 | 10 |
| | 45 | 55 | 45 |
| Prietok: | 47-60 | 90 | 10 |
| | 1,2 mL/min | | |
| Nástrek: | 10 µL | | |
| Teplota kolóny: | 40°C | | |
| Teplota autosampleru: | lab. | | |
| Detekcia: | UV 230nm | | |

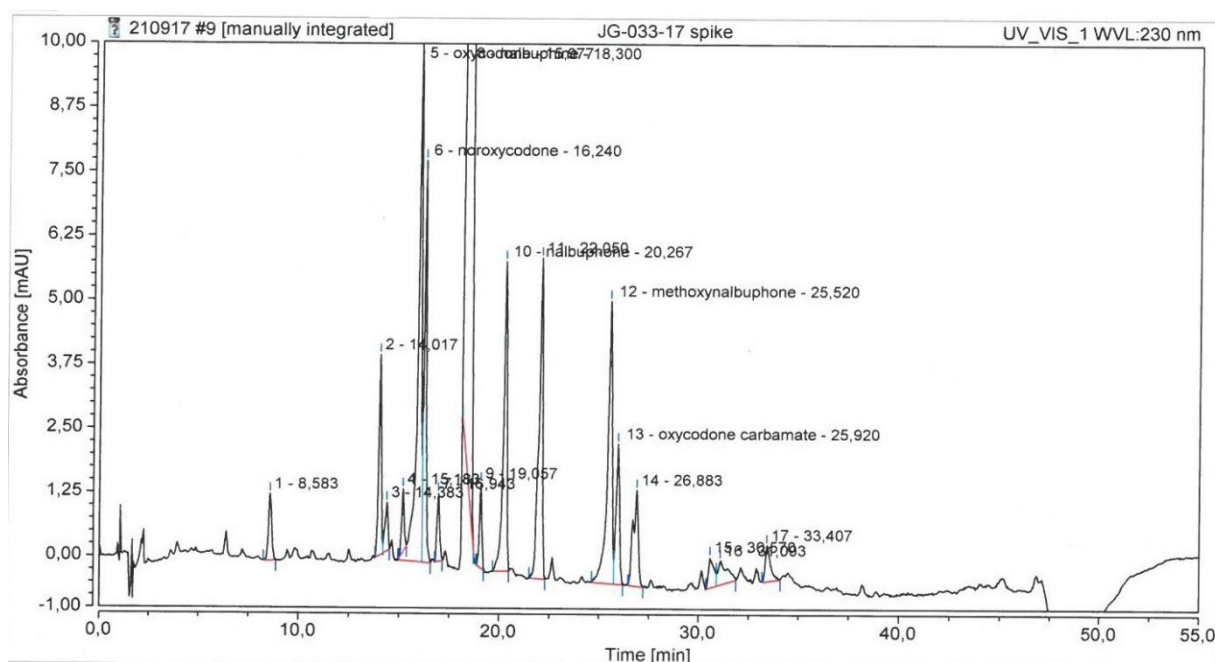


Obrázok 13: Výsledný chromatogram pri použití TP III

Nasledujúcou testovanou metódou bola TP IV. Ako je zrejmé z Tab.7, chromatografické podmienky zostali rovnaké ako v predošlom prípade. Zmena nastala v pH, ktorého hodnotu sme mierne posunuli k alkalickému oblasti. Výsledná hodnota pH bola 5,5. Vďaka zvýšeniu pH sú píky vyššie a štíhlejšie, no majú výrazný frontujúci tvar. Ten býva najčastejšie dôsledkom preťaženia kolóny vzorkou. Môžeme konštatovať, že podmienky pre separáciu boli nedostatočné a elúcia jednotlivých pík s podmienkou separácie na základnú líniu nebola splnená.

Tab.7 Testované chromatografické podmienky a výsledky IV – TP IV

| | | | |
|-----------------------|--|----|----|
| Prípravok: | Nalbufin hydrochlorid | | |
| Špecifikácia: | N/A | | |
| Zariadenie: | Dionex Ultimate 3000 | | |
| Kolóna: | Symmetry Shield C18 150x4,6mm; 5µm | | |
| Mobilná fáza: | MF A: 2,2 g oktansulfonát sodný do 2000 ml vody + 1mL TEA; pH = 5,5 s H ₃ PO ₄ | | |
| | MF B: Acetonitril | | |
| | t | %A | %B |
| | 0 | 90 | 10 |
| | 45 | 55 | 45 |
| Prietok: | 1,2 mL/min | | |
| | Nástrek: | | |
| | 10 µl | | |
| | Teplota kolóny: | | |
| Teplota autosampleru: | 40°C | | |
| | lab. | | |
| Detekcia: | UV 230nm | | |



Obrázok 14: Výsledný chromatogram pri použití TP IV

V ďalších dvoch testovaných chromatografických podmienkach sme použili dlhšiu kolónu Nova-Pak C8 s rozmermi 250x4,6mm a priemerom 4 μ m. Zmena nastala aj v zložení MF, kedy sme sodnú soľ oktsulfonátu zamenili za hexansulfonát sodný. Gradient sme nahradili za izokratický typ elúcie s dĺžkou analýzy 70 min.

Výsledkom testovania chromatografických podmienok TP V a TP VI je zistenie, že ani pri zmene podmienok neprišlo k zlepšeniu separácie jednotlivých analytov. Rozlíšenie pík a ich tvar (frontovanie) nebol dostatočný. Testovanie týchto mobilných fáz nesplňovalo podmienky pre optimálnu analýzu a preto neboli zohľadnené pri výbere vhodných separačných podmienok pre hodnotenie čistoty Nalbufinu.

Tab.8 Testované chromatografické podmienky a výsledky V – TP V

| | |
|-----------------------|---|
| Prípravok: | Nalbufin hydrochlorid – 13.10. |
| Špecifikácia: | N/A |
| Zariadenie: | Dionex Ultimate 3000 |
| Kolóna: | Nova-Pak C8 250x4,6mm; 4 μ m |
| Mobilná fáza: | MF: 0,65 g hexansulfonát sodný do 700 ml vody + 300 mL MeOH + 2 mL TEA + 5 mL H ₃ PO ₄ (70:30, v/v) - úprava pH = 2,5 s roztokom NaOH Izokratická metóda; t = 70 min. |
| Prietok: | 1,0 mL/min. |
| Nástrek: | 10 μ l |
| Teplota kolóny: | 50°C |
| Teplota autosamplera: | lab. |
| Detekcia: | UV 206nm |

Tab.9 Testované chromatografické podmienky a výsledky VI – TP VI

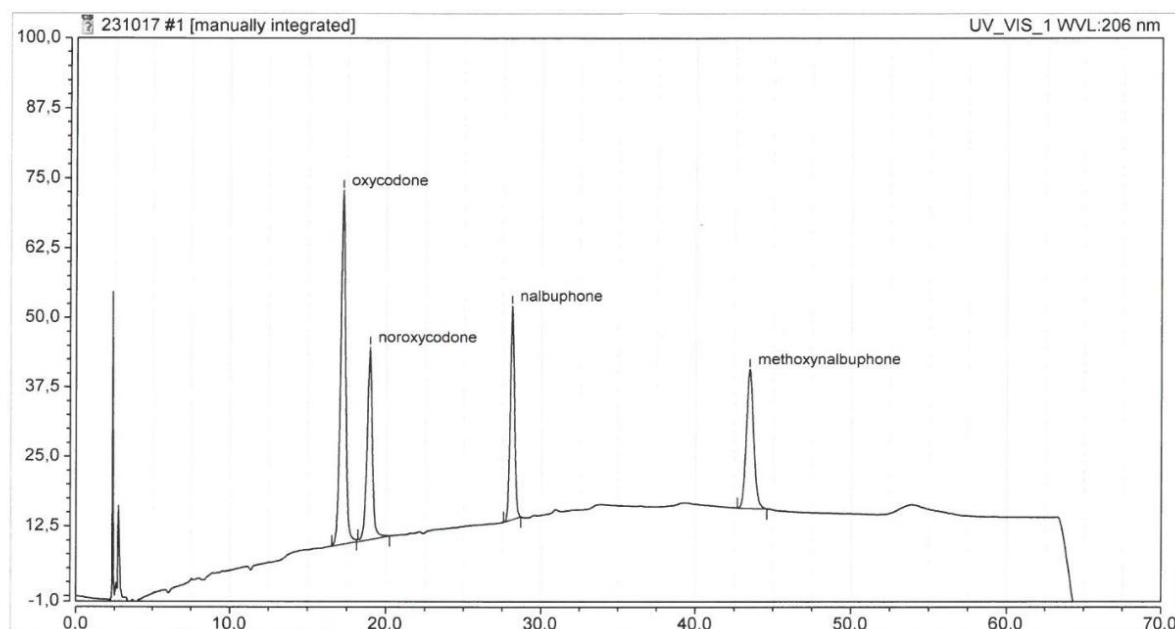
| | |
|-----------------------|---|
| Prípravok: | Nalbufin hydrochlorid-17.10. |
| Špecifikácia: | N/A |
| Zariadenie: | Dionex Ultimate 3000 |
| Kolóna: | Nova-Pak C8 250x4,6mm; 4µm |
| Mobilná fáza: | MF: 0,65 g hexansulfonát sodný do 800 ml vody + 200 mL MeOH + 2 mL TEA + 5 mL H ₃ PO ₄ (80:20, v/v) - úprava pH = 2,5 s roztokom NaOH Izokratická metóda; t = 70 min. |
| Prietok: | 1,0 mL/min. |
| Nástrek: | 10 µl |
| Teplota kolóny: | 50°C |
| Teplota autosamplera: | lab. |
| Detekcia: | UV 206nm |

Siedme testované chromatografické podmienky boli v zložení mobilnej fázy, ktorá sa skladala z dvoch zložiek A a B. Išlo o gradientový typ elúcie s úpravou pH na hodnotu 2,5 hydroxidom sodným. Zložku A tvoril vodný podiel s rozpusteným hexansulfonátom sodným ku ktorému sa pridal podiel metanolu v objeme 100 mL (90:10, v/v). Zložkou B bol hexansulfonát sodný rozpustený v objeme 850 mL ku ktorému bolo pridaných 150 mL MeOH (85:15, v/v). V oboch prípadoch sa ku jednotlivým zložkám A a B pridalo po 2 mL TEA a 5 mL kyseliny fosforečnej. Súhrnné podmienky separácie sú uvedené v Tab.10. Ako môžeme vidieť z chromatografického záznamu na Obrázku 15, separácia Oxykodónu a Noroxykodónu prebehla v dostatočnej miere. Dôvodom neúspešnosti tejto analýzy je fakt, že absenteje elúcia píku Nalbufinu.

Tab.10 Testované chromatografické podmienky a výsledky VII – TP VII

| | |
|---------------|---|
| Prípravok: | Nalbufin hydrochlorid |
| Špecifikácia: | N/A |
| Zariadenie: | Dionex Ultimate 3000 |
| Kolóna: | Nova-Pak C8 250x4,6mm; 4µm |
| Mobilná fáza: | MF A: 0,85 g hexansulfonát sodný do 900 ml vody + 100 mL MeOH + 2 mL TEA + 5 mL H ₃ PO ₄ (90:10, v/v) - úprava pH = 2,5 s roztokom NaOH MF B: 0,80 g hexansulfonát sodný do 850 ml vody + 150 mL MeOH + 2 mL TEA + 5 mL H ₃ PO ₄ (85:15, v/v) |

| | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|-------|-------|
| | - úprava pH = 2,5 s roztokom NaOH | | |
| | t | %A | %B |
| | 0-30 | 100-0 | 0-100 |
| | 30-60 | 0 | 100 |
| | 60-61 | 0-100 | 100-0 |
| | 61-70 | 100 | 0 |
| Prietok: | 1,0 mL/min. | | |
| Nástrek: | 10 µl | | |
| Teplota kolóny: | 50°C | | |
| Teplota autosamplera: | lab. | | |
| Detekcia: | UV 206nm | | |

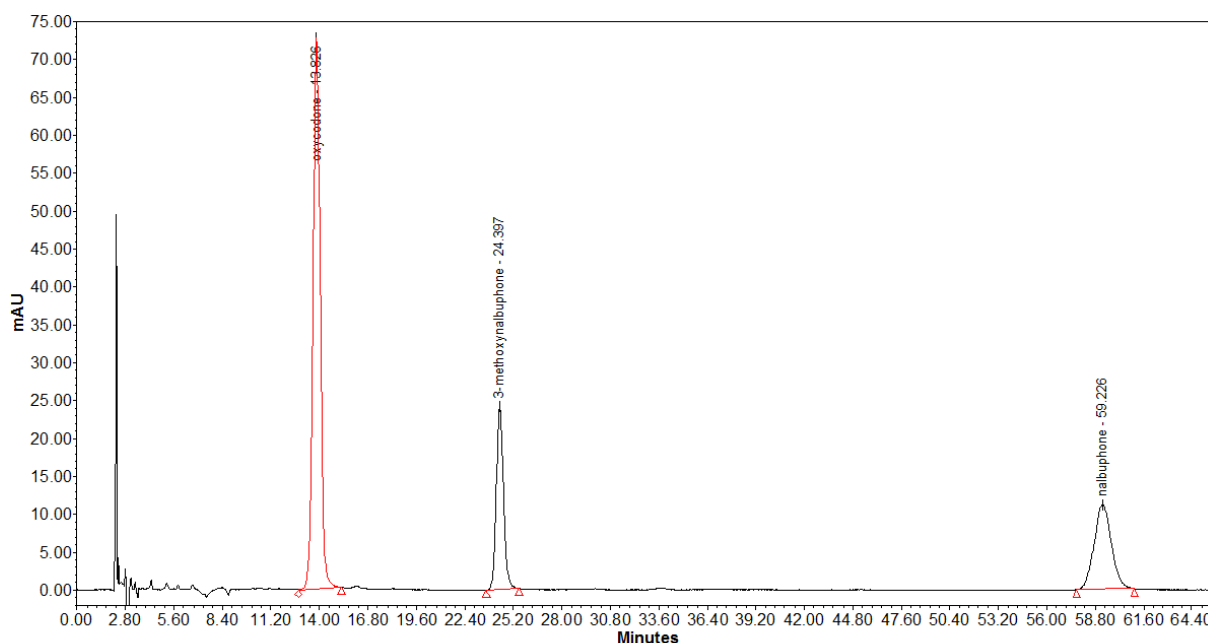


Obrázok 15: Výsledný chromatogram pri použití TP VII

V nasledujúcej analýze sme zvolili izokratický typ elúcie s dĺžkou separácie 70 min. Mobilná fáza bola v zložení vodný roztok oktansulfonátu sodného s acetonitrilom v pomere 85:15 (v/v) a 2 mL TEA. pH bolo upravené na hodnotu 2,5 kyselinou fosforečnou. Detailné zloženie separačných podmienok uvádzame v Tab.11. Ako môžeme vidieť na chromatografickom zázname na Obrázku 16, za týchto podmienok neprišlo k separácii Oxykodónu a Noroxykodónu. Predpokladáme, že obe nečistoty eluovali v jednom píku.

Tab.11 Testované chromatografické podmienky a výsledky VIII – TP VIII

| | |
|-----------------------|--|
| Prípravok: | Nalbufin hydrochlorid |
| Špecifikácia: | N/A |
| Zariadenie: | Dionex Ultimate 3000 |
| Kolóna: | Nova-Pak C18 150x3,9mm; 4µm |
| Mobilná fáza: | MF: 0,92 g oktansulfonát sodný do 850 mL vody + 150 mL ACN + 2 mL TEA úprava pH = 2,5 s H ₃ PO ₄ Izokratická metóda; t = 70 min. |
| Prietok: | 1,0 mL/min. |
| Nástrek: | 10 µl |
| Teplota kolóny: | 50°C |
| Teplota autosamplera: | lab. |
| Detekcia: | UV 206nm |



Obrázok 16: Výsledný chromatogram pri použití TP VIII

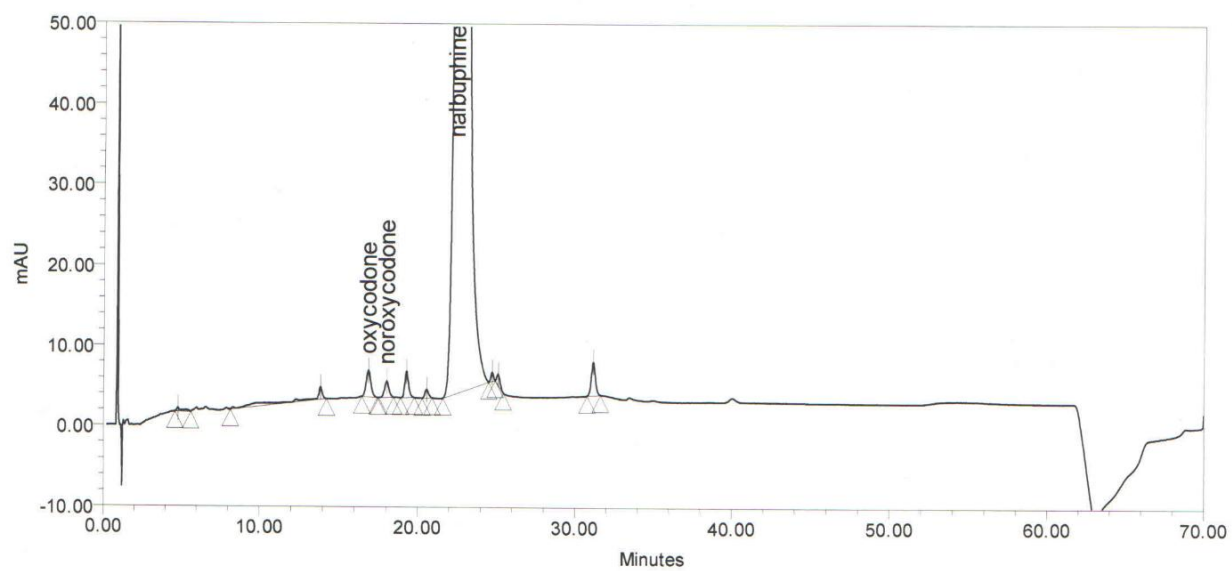
Pri separácii na C18 kolóne sme použili mobilnú fázu, ktorá sa preukázala ako najvhodnejšia a pozostávala z dvoch zložiek A a B. Mobilná fáza v spojení s kolónou Nova-Pak C18 s rozmermi 150x3,9mm a priemerom 4µm nám poskytla vyhovujúce rozlíšenie analytov a s ohľadom na vnútorný priemer kolóny sa zlepšil pomer signál/šum v nízkych koncentráciách. Ako zložka A bol zvolený vodný roztok modifikátora ako rozpúšťadla s menším podielom acetonitrilu. Zloženie MF A bolo nasledujúce: 0,97 g oktansulfonátu sodného sa rozpustilo v 900 mL vody ku ktorej sa pridalo 100 mL acetonitrilu a 2 mL trietylaminu. Vzniknutý roztok bol upravený kyselinou fosforečnou na výsledné pH 2,5. Zložkou B bol vodný roztok modifikátora s väčším podielom ACN. MF B mala nasledujúce

zloženie: 0,86 g oktansulfonátu sodného sa rozpustilo v 800 mL vody ku ktorej sa pridalo 200 mL acetonitrilu a 2 mL TEA. Výsledné pH bolo upravené kyselinou fosforečnou na 2,5. Gradient MF bol upravený tak, aby bolo dosiahnuté dostatočné rozlíšenie Nalbufinu, Oxykodónu a Noroxykodónu. Od nultej minúty zo 100 %A do 30 min. na 0 %A. V 30-60 min. 0 %A, 60-61 min. s lineárnou zmenou na 100 %A, 61-70 min. ekvilibrácia do pôvodných podmienok na 100 %A pri prietoku 1 mL/min. Pre ideálny chromatografický pík, ktorý má Gaussovský profil sa bolo nutné vyhnúť dvom najvýraznejším asymetriám: „frontovanie“ a chvostovanie „tailing.“ Prvá zmienená asymetria býva najčastejšie dôsledkom preťaženia kolóny vzorkou. Druhá menovaná asymetria býva spôsobená, ak niektoré miesta stacionárnej fázy zachytávajú stanovovanú látku silnejšie ako iné. Ako kompenzáciu sme sa snažili vyvážiť gradient mobilnej fázy, prietokovú rýchlosť a jej pH. Pre ekvilibráciu kolóny medzi jednotlivými stanoveniami je vhodné spúšťať ďalšiu analýzu v 10 minútových intervaloch. Dávkovaný objem vzorky autosamplerom bol po celú dobu analýzy 10 µl.

Z jednotlivých chromatografických záznamov môžeme potvrdiť, že sa jedná o separačné podmienky, ktoré jednoznačne rozdeľujú Nalbufin a jeho nečistoty (Oxykodón a Noroxykodón). Výsledkom vývoja je presná a dostatočne citlivá analytická metóda RP-HPLC s UV detekciou.

Tab.12 Testované chromatografické podmienky a výsledky IX – TP IX

| | | | |
|-----------------------|---|-------|-------|
| Prípravok: | Nalbufin hydrochlorid | | |
| Špecifikácia: | N/A | | |
| Zariadenie: | Dionex Ultimate 3000 | | |
| Váhy: | Mettler Toledo XS 205 | | |
| Kolóna: | Nova Pak C18 150x3,9mm, 4µm | | |
| Mobilná fáza: | MF A: 0,97 g oktansulfonát sodný do 900 mL H ₂ O + 100 mL ACN + 2 mL TEA, úprava pH = 2,5 s H ₃ PO ₄ | | |
| | MF B: 0,86 g oktansulfonát sodný do 800 mL H ₂ O + 200 mL ACN + 2 mL TEA, úprava pH = 2,5 s H ₃ PO ₄ | | |
| | t | %A | %B |
| | 0-30 | 100-0 | 0-100 |
| | 30-60 | 0 | 100 |
| | 60-61 | 0-100 | 100-0 |
| | 61-70 | 100 | 0 |
| Prietok: | 1,0 mL/min. | | |
| Nástrek: | 10 µl | | |
| Teplota kolóny: | 50°C | | |
| Teplota autosamplera: | lab. | | |
| Detekcia: | UV 206nm | | |



Obrázok 17: Výsledný chromatogram pri použití TP IX

4.4.2 Validácia metódy

4.4.2.1 Linearita

Koncentračný rozsah Nalbufinu sa v našej práci pohyboval v rozpätí 0,3 až 4,5 µg/mL. Na Obrázku 19 je znázornený chromatogram elúcie týchto štandardov pri uvedenom koncentračnom rozmedzí 0,30; 0,75; 1,50; 2,25; 3,00; 3,75; 4,50. Rovnica lineárnej regresie pre tento koncentračný interval je $y = 616847x + 1261,8$ a koeficient determinácie 0,9999.

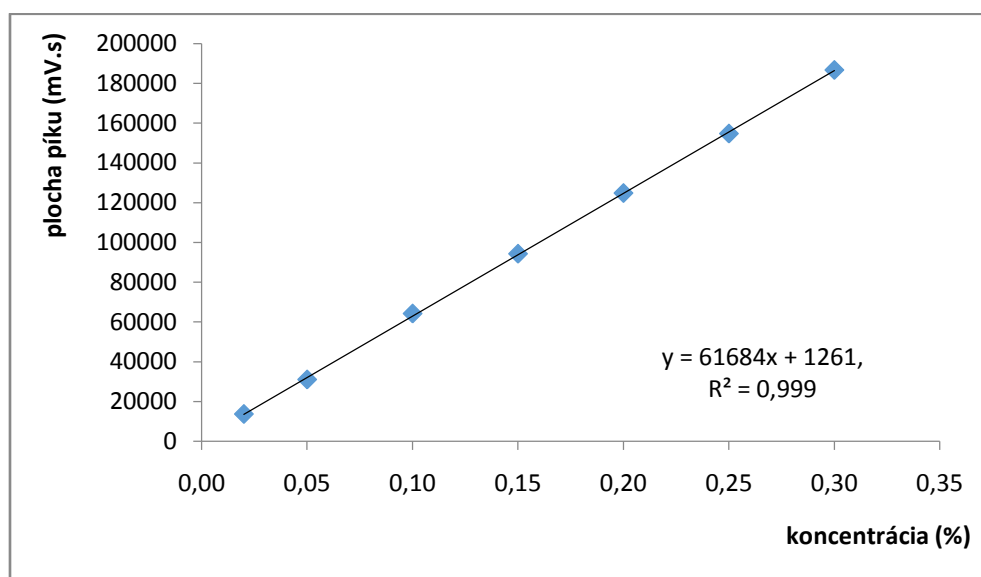
Nalbufin hydrochlorid

Nalbufin - linearita

základný roztok: 20,03 mg / 10 mL, zr. 2/100 mL

Tab.13 Hodnoty pre výpočet kalibračnej krivky Nalbufinu

| riedenie základného roztoku (mL/100mL) | koncentrácia (%) | koncentrácia (µg/mL) | plocha píku (mV.s) | plocha / konc. | rozsah (%) |
|--|------------------|----------------------|--------------------|----------------|------------|
| 1,0 | 0,0200 | 0,3005 | 13649 | 681428 | 10 |
| 2,5 | 0,0501 | 0,7511 | 31009 | 619251 | 25 |
| 5,0 | 0,1002 | 1,5023 | 64175 | 640789 | 50 |
| 7,5 | 0,1502 | 2,2534 | 94241 | 627332 | 75 |
| 10,0 | 0,2003 | 3,0045 | 124761 | 622871 | 100 |
| 12,5 | 0,2504 | 3,7556 | 154674 | 617769 | 125 |
| 15,0 | 0,3005 | 4,5068 | 186658 | 621261 | 150 |
| | | | Priemer: | 634907 | |
| | | | SD: | 24248 | |
| | | | RSD (%): | 3,82 | |



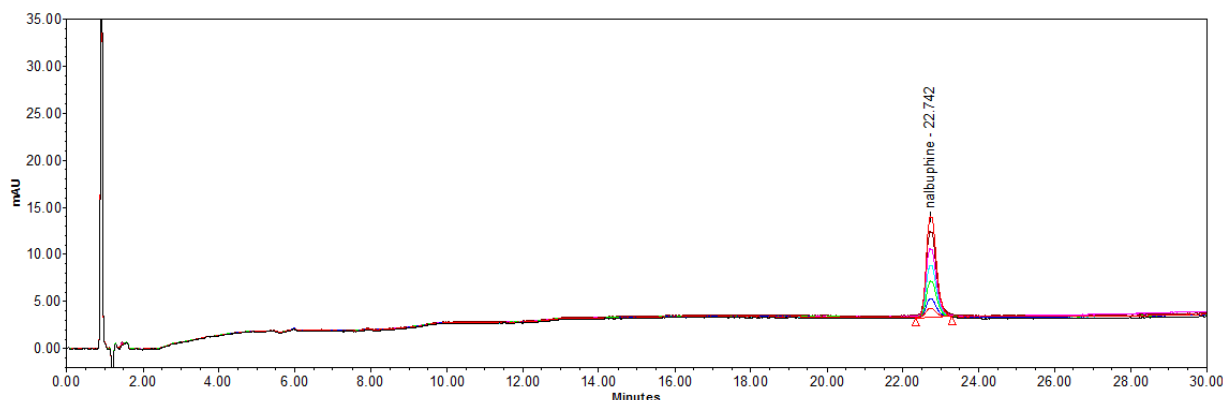
Obrázok 18: Kalibračná krivka Nalbufinu

požiadavka:

$R^2 \geq 0,9990$

výsledok:

$R^2 = 0,9999$



Obrázok 19: Chromatografický záznam elúcie roztokov štandardu Nalbupínu v koncentračnom rozsahu 0,3 - 4,5 µg/mL.

Koncentračný rozsah nečistoty Oxykodónu sa v našej práci pohyboval v rozpätí 0,3 až 4,5 µg/mL. Na Obrázku 21 je znázornený chromatogram elúcie týchto štandardov pri uvedenom koncentračnom rozmedzí 0,30; 0,75; 1,50; 2,25; 3,00; 3,75; 4,50. Rovnica lineárnej regresie pre tento koncentračný interval je $y = 849484x - 2328,5$ a koeficient determinácie 0,9999.

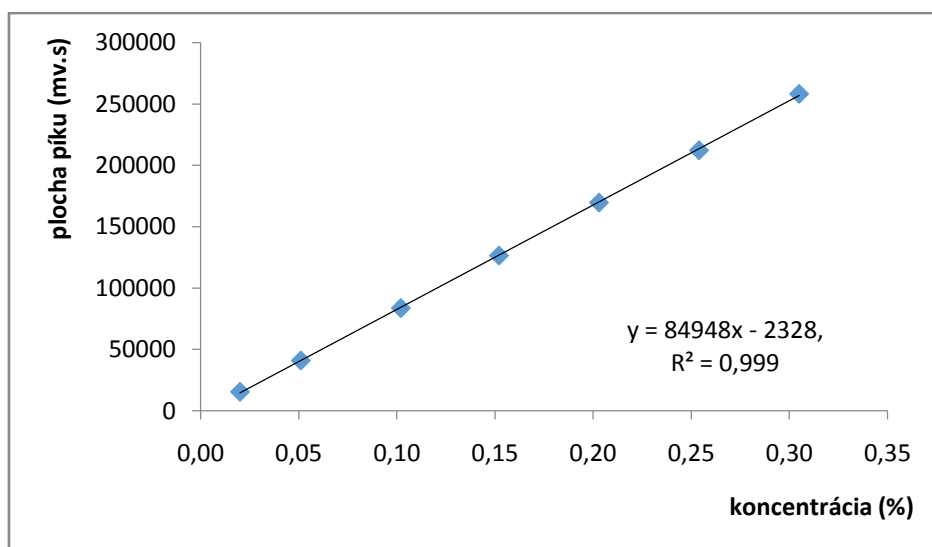
Nalbufin hydrochlorid

nečistota Oxykodón - linearita

základný roztok: 20,320 mg / 10 mL, zr. 2/100 mL

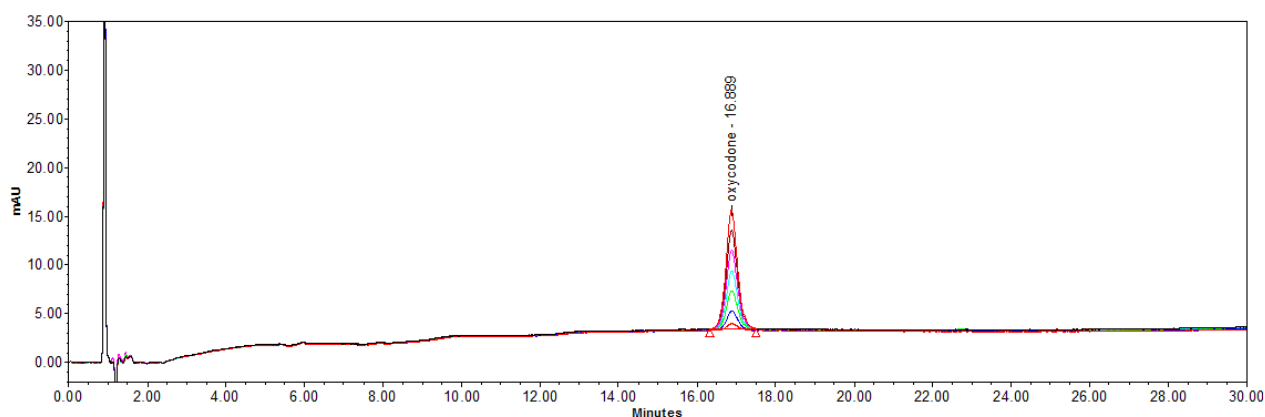
Tab.14 Hodnoty pre výpočet kalibračnej krivky nečistoty Oxykodónu

| riedenie základného roztoku (mL/100mL) | koncentrácia (%) | koncentrácia (µg/mL) | plocha píku (mV.s) | plocha / konc. | rozsah (%) |
|---|---------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|------------|
| 1 | 0,020 | 0,3048 | 15521 | 763829 | 10 |
| 2,5 | 0,051 | 0,7620 | 41039 | 807854 | 25 |
| 5 | 0,102 | 1,5240 | 83736 | 824173 | 50 |
| 7,5 | 0,152 | 2,2860 | 126546 | 830354 | 75 |
| 10 | 0,203 | 3,0480 | 169700 | 835138 | 100 |
| 12,5 | 0,254 | 3,8100 | 212313 | 835878 | 125 |
| 15 | 0,305 | 4,5720 | 258235 | 847228 | 150 |
| Priemer: | | | | 816204 | |
| SD: | | | | 27648 | |
| RSD(%) | | | | 3,39 | |



Obrázok 20: Kalibračná krivka Oxykodónu

požiadavka: $R^2 \geq 0,9990$ výsledok: $R^2 = 0,9999$



Obrázok 21: Chromatografický záznam elúcie roztokov štandardu Oxykodónu v koncentračnom rozsahu 0,02-0,3%

Koncentračný rozsah nečistoty Noroxykodónu sa v práci pohyboval v rozpätí 0,3 až 4,5 $\mu\text{g/mL}$. Na Obrázku 23 je znázornený chromatogram elúcie týchto štandardov pri uvedenom koncentračnom rozmedzí 0,30; 0,75; 1,50; 2,25; 3,00; 3,75; 4,50. Rovnica lineárnej regresie pre tento koncentračný interval je $y = 675363x - 2969,3$ a koeficient determinácie 0,9998.

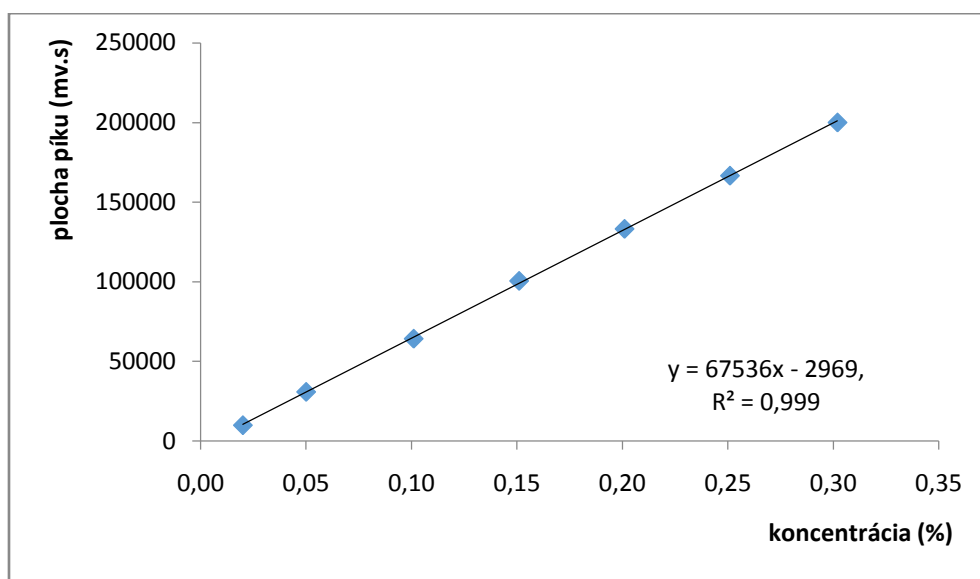
Nalbufin hydrochlorid **nečistota Noroxykodón -linearita**

základný roztok: 20,320 mg / 10 mL, zr. 2/100 mL

Tab.15 Hodnoty pre výpočet kalibračnej krivky nečistoty Noroxykodónu

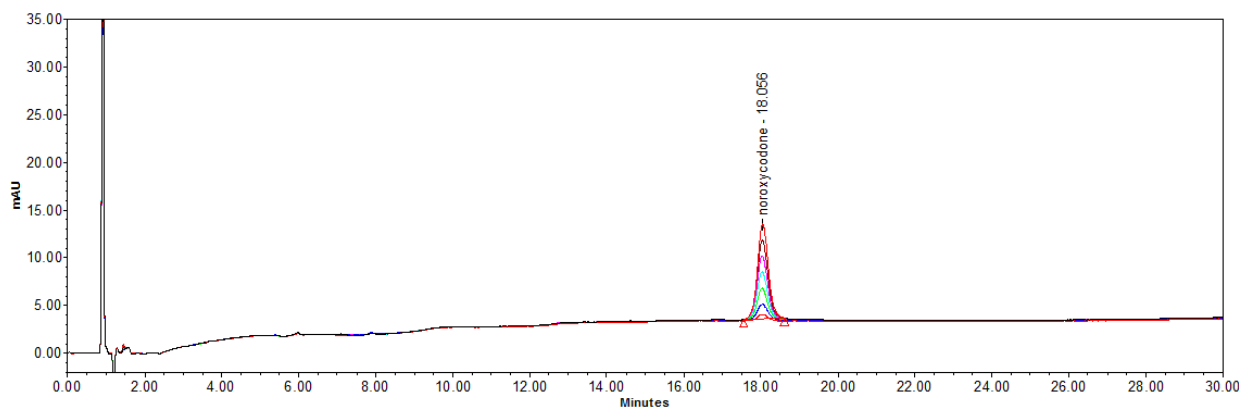
| riedenie základného roztoku (mL/100mL) | koncentrácia (%) | koncentrácia ($\mu\text{g/mL}$) | plocha píku (mV.s) | plocha / konc. | rozsah (%) |
|---|---------------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------------|------------|
| 1 | 0,020 | 0,3015 | 10009 | 497960 | 10 |
| 2,5 | 0,050 | 0,7538 | 30937 | 615662 | 25 |
| 5 | 0,101 | 1,5075 | 64328 | 640080 | 50 |

| riedenie základného roztoku (mL/100mL) | koncentrácia (%) | koncentrácia (µg/mL) | plocha píku (mV.s) | plocha / konc. | rozsah (%) |
|---|---------------------|-------------------------|---|-------------------|------------|
| 7,5 | 0,151 | 2,2613 | 100609 | 667390 | 75 |
| 10 | 0,201 | 3,0150 | 133283 | 663100 | 100 |
| 12,5 | 0,251 | 3,7688 | 166660 | 663323 | 125 |
| 15 | 0,302 | 4,5225 | 200079 | 663612 | 150 |
| | | | Priemer: 624586 SD: 65069 RSD (%): 10,42 | | |



Obrázok 22: Kalibračná krivka Noroxykodónu

| | | | |
|-------------|-------------------|-----------|----------------|
| požiadavka: | $R^2 \geq 0,9990$ | výsledok: | $R^2 = 0,9998$ |
|-------------|-------------------|-----------|----------------|



Obrázok 23: Chromatografický záznam elúcie roztokov štandardu Noroxykodónu v koncentračnom rozsahu 0,02-0,3%

4.4.2.2 Presnosť

Nalbufin hydrochlorid

presnosť

Pri testoch na presnosť bola meraná tesnosť zhody šesť po sebe idúcich meraní pri koncentrácií 2 mg/mL. Z výsledných plôch pík boli vypočítané relatívne smerodajné odchýlky. Výsledná hodnota RSD bola 0,44%, čo vyjadruje hodnotu, ktorá spĺňa maximálny povolený limit.

Tab.16 Parametre presnosti pre hodnotenie Nalbufinu

| n.vz (mg) | Pvz | n.št (mg) | Pšt | obsah (%) |
|-----------------|-------|-----------|-------|---------------|
| 20,09 | 59562 | 20,05 | 58635 | 0,2028 |
| 20,06 | 59416 | 20,05 | 58635 | 0,2026 |
| 20,07 | 59799 | 20,05 | 58635 | 0,2038 |
| 20,07 | 60088 | 20,05 | 58635 | 0,2048 |
| 20,04 | 59336 | 20,05 | 58635 | 0,2025 |
| 20,07 | 59786 | 20,05 | 58635 | 0,2037 |
| Priemer: | | | | 0,2033 |
| SD: | | | | 0,001 |
| RSD (%): | | | | 0,44 |

požiadavka: RSD ≤ 5,0 %

výsledok: **RSD = 0,44 %**

4.4.2.3 Limit detekcie – LOD, limit kvantifikácie – LOQ

Nalbufin hydrochlorid

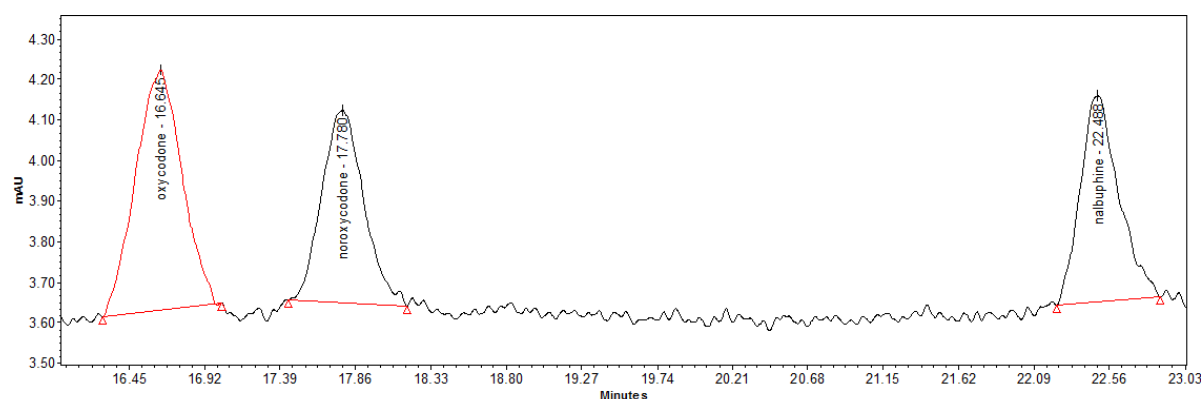
Nalbufin - LOD, LOQ

V Tab.17 je uvedený detekčný limit *LOD* a limit kvantifikácie *LOQ* pre štandardný roztok Nalbufinu v koncentračnom rozsahu 0,02-0,3%. Limit detekcie *LOD* bol stanovený na hodnotu 0,069 µg/mL. Limit kvantifikácie *LOQ* mal hodnotu 0,209 µg/mL.

Tab.17 Základné analytické parametre Nalbufinu metódou HPLC

| Analyt | Koncentračný rozsah [%] | Rovnica regresie | R ² | LOD [µg/mL] / % | LOQ [µg/mL] / % | Vlnová dĺžka [nm] |
|--------|-------------------------|----------------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| NBF | 0,02 - 0,3 | y = 350591x + 174,12 | 0,9999 | 0,069 / 0,01 | 0,209 / 0,01 | 206 |

požiadavka: LOQ ≤ 0,02 % výsledok: **LOQ = 0,01 %**



Obrázok 24: Chromatografický záznam elúcie Oxykodónu, Noroxykodónu a Nalbufinu, roztoky štandardov s koncentráciou 0,015%.

Nalbufin hydrochlorid

Nalbufin - LOQ opakovateľnosť

základný roztok: 20,03 mg / 10 mL, zr. 2/100 mL

LOQ opakovateľnosť

| | |
|-----------------|-------------|
| 1. nástrek | 507 |
| 2. nástrek | 507 |
| 3. nástrek | 502 |
| 4. nástrek | 504 |
| 5. nástrek | 507 |
| 6. nástrek | 505 |
| Priemer: | 505 |
| SD: | 2 |
| RSD (%): | 0,40 |

LOD opakovateľnosť

| | |
|-----------------|-------------|
| 1. nástrek | 196 |
| 2. nástrek | 220 |
| 3. nástrek | 222 |
| Priemer: | 213 |
| SD: | 14 |
| RSD (%): | 6,57 |

požiadavka: RSD ≤ 7,0% výsledok: **RSD = 0,40 %**

V Tab.18 je uvedený detekčný limit *LOD* a limit kvantifikácie *LOQ* pre štandardný roztok Oxykodónu v koncentračnom rozsahu 0,02-0,3%. Limit detekcie *LOD* bol stanovený na hodnotu 0,053 µg/mL. Limit kvantifikácie *LOQ* mal hodnotu 0,161 µg/mL.

Tab.18 Základné analytické parametre nečistoty Oxykodónu metódou HPLC

| Analyt | Koncentračný rozsah [%] | Rovnica regresie | R ² | LOD [µg/mL] / % | LOQ [µg/mL] / % | Vlnová dĺžka [nm] |
|--------|-------------------------|---------------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| OXY | 0,02 - 0,3 | y = 41035x - 136,24 | 0,9999 | 0,053 / 0,01 | 0,161 / 0,01 | 206 |

požiadavka: LOQ ≤ 0,02 %

výsledok: **LOQ = 0,01 %**

Chromatografický záznam elúcie Oxykodónu so štandardnou koncentráciou 0,015% vid' Obrázok 24.

základný roztok: 20,320 mg / 10 mL, zr. 2/100 mL

LOQ opakovateľnosť

| | |
|-----------------|-------------|
| 1. nástrek | 572 |
| 2. nástrek | 590 |
| 3. nástrek | 592 |
| 4. nástrek | 563 |
| 5. nástrek | 593 |
| 6. nástrek | 598 |
| Priemer: | 585 |
| SD: | 14 |
| RSD (%): | 2,39 |

LOD opakovateľnosť

| | |
|-----------------|-------------|
| 1. nástrek | 190 |
| 2. nástrek | 210 |
| 3. nástrek | 210 |
| Priemer: | 203 |
| SD: | 12 |
| RSD (%): | 5,91 |

požiadavka: RSD ≤ 7,0 %

výsledok: **RSD = 2,39 %**

V Tab.19 je uvedený detekčný limit *LOD* a limit kvantifikácie *LOQ* pre štandardný roztok Noroxykodónu v koncentračnom rozsahu 0,02-0,3%. Limit detekcie *LOD* bol stanovený na hodnotu 0,048 µg/mL. Limit kvantifikácie *LOQ* mal hodnotu 0,147 µg/mL.

Tab.19 Základné analytické parametre nečistoty Oxykodónu metódou HPLC

| Analyt | Koncentračný rozsah [%] | Rovnica regresie | R ² | LOD [µg/mL] / % | LOQ [µg/mL] / % | Vlnová dĺžka [nm] |
|--------|-------------------------|---------------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| NRX | 0,02 - 0,3 | y = 33354x - 44,716 | 0,9999 | 0,048 / 0,01 | 0,147 / 0,01 | 206 |

požiadavka:

LOQ ≤ 0,02 %

výsledok:

LOQ = 0,01 %

Chromatografický záznam elúcie Noroxykodónu so štandardnou koncentráciou 0,015% vid' Obrázok 24.

základný roztok:

20,320 mg / 10 mL, zr. 2/100 mL

LOQ opakovateľnosť

| | |
|-----------------|-------------|
| 1. nástrek | 485 |
| 2. nástrek | 478 |
| 3. nástrek | 487 |
| 4. nástrek | 471 |
| 5. nástrek | 473 |
| 6. nástrek | 478 |
| Priemer: | 479 |
| SD: | 6 |
| RSD (%): | 1,25 |

LOD opakovateľnosť

| | |
|-----------------|-------------|
| 1. nástrek | 134 |
| 2. nástrek | 157 |
| 3. nástrek | 144 |
| Priemer: | 145 |
| SD: | 12 |
| RSD (%): | 8,28 |

požiadavka: RSD ≤ 7,0 %

výsledok:

RSD = 1,25 %

4.4.2.4 Robustnosť

Po vývoji metódy a výbere cieľových chromatografických podmienok s najlepším pomerom medzi rozlíšením a dĺžkou analýzy (zloženie MF vid' kap. 4.2.3) bola testovaná citlivosť metódy na zmeny pH tejto mobilnej fázy. Pre každé pH(2,4 a 2,6) bolo meranie zaznamenané šesťkrát. Z jednotlivých plôch pík bol vypočítaný aritmetický priemer a vyhodnotená relatívna smerodajná odchýlka.

Testy rôznych pH (2,4 a 2,6), nevykázali žiadne štatisticky významné rozdiely v RT analytov ani tvare pík na chromatograme. Ako môžeme vidieť v Tab.20 súhrnných parametrov, boli splnené jednotlivé parametre s ich akceptačnými limitmi.

Druhým sledovaným faktorom pre robustnosť metódy bola zmena teploty kolóny. Teplota bola testovaná iba v jednom smere a to o 5°C nižšou teplotou. Podmienky špecifikácie udávajú teplotu kolóny 50°C. Následným zvýšením teploty kolóny na 55°C by mohlo prísť k jej znehodnoteniu a zničeniu.

Pre teplotu 45°C bolo meranie zaznamenané šesťkrát. Z jednotlivých plôch pík bol vypočítaný aritmetický priemer a vyhodnotená relatívna smerodajná odchýlka. Hodnotená bola aj zmena rozlíšenia pre testovanú teplotu.

Test zmeny teploty kolóny v priebehu separácie nezaznamenal žiadne štatisticky významné rozdiely v RT analytov ani tvare pík na chromatograme. Ako môžeme vidieť v Tab.20 súhrnných parametrov, boli splnené jednotlivé parametre s ich akceptačnými limitmi, ktoré sme mali stanovené ako hraničné.

Chromatografická metóda bola overená v daných validačných parametroch a môžeme povedať, že je vhodná na stanovenie čistoty Nalbufin hydrochloridu.

| Nalbufin hydrochlorid | robustnosť |
|------------------------------|-------------------|
|------------------------------|-------------------|

zariadenie: Dionex Ultimate 300
kolóna: Nova-Pak C18 150 x 3,9 mm; 4 µm

Tab.20 Súhrn parametrov pri testovaní robustnosti metódy pre hodnotenie čistoty Nalbufinu

| parameter | akceptačný limit | podmienky vyvinutej metódy | T = 45 °C | pH = 2,4 | pH = 2,6 |
|------------------------|--------------------|----------------------------|------------|------------|------------|
| rozlíšenie | min 2,0 | 3,24 | 3,34 | 3,19 | 3,15 |
| zmena (%) | max 5,0 % | — | 3,1 | 1,5 | 2,8 |
| opakovateľnosť RSD (%) | max 5,0 % | 1,36 | 3,45 | 0,85 | 1,29 |
| RT NBF (min) | približne 22,5 min | 22,48 | 23,64 | 21,97 | 21,56 |

5 ZÁVER

Diplomová práca sa zaoberá vývojom a validáciou analytickej metódy pre hodnotenie čistoty Nalbufin hydrochloridu.

Prvá časť diplomovej práce sa venuje literárnemu prehľadu a je rozdelená na niekoľko podkapitol. Prvá podkapitola sa venuje všeobecnej charakteristike chromatografie. Druhá podkapitola približuje problematiku opioidov a opiátov, ich rozdelenie, mechanizmus účinku, terapeutické využitie a v neposlednej rade interakcie opiátov s alkoholom. Tretia podkapitola literárneho prehľadu je zameraná na vlastnosti a použitie Nalbufin hydrochloridu. Štvrtá podkapitola je venovaná podmienkam HPLC analýzy Nalbufin hydrochloridu v rôznych matriciach. Piata, posledná podkapitola definuje základné validačné parametre.

Druhá časť diplomovej práce je experimentálna a zaoberá sa vývojom a validáciou HPLC metódy s UV detekciou na hodnotenie čistoty Nalbufin hydrochloridu.

V prvom prípade sme vyvíjali chromatografickú metódu na kolóne s reverznou fázou C18. Metóda bola v priebehu vývoja modifikovaná (viz kapitola 4.4.1). Zmeny zahrňovali testy viacerých mobilných fáz v spojení s viacerými chromatografickými kolónami.

Pri separácii na kolóne Nova-Pak C18 sme použili mobilnú fázu, ktorá sa preukázala ako najvhodnejšia a pozostávala z dvoch zložiek A a B. Mobilná fáza v spojení s kolónou Nova-Pak C18 nám poskytla dostatočné rozlíšenie analytov. Ako zložka A bol zvolený vodný roztok modifikátora ako rozpúšťadla s menším podielom acetonitrilu. Zloženie MF A bolo nasledujúce: 0,97 g oktansulfonátu sodného sa rozpustilo v 900 mL vody ku ktorej sa pridalo 100 mL acetonitrilu a 2 mL trietylamínu. Vzniknutý roztok bol upravený kyselinou fosforečnou na výsledné pH 2,5. Zložkou B bol vodný roztok modifikátora s väčším podielom ACN. MF B mala nasledujúce zloženie: 0,86 g oktansulfonátu sodného sa rozpustilo v 800 mL vody ku ktorej sa pridalo 200 mL acetonitrilu a 2 mL TEA. Výsledné pH bolo upravené kyselinou fosforečnou na 2,5. Gradient MF bol upravený tak, aby bolo dosiahnuté dostatočné rozlíšenie Nalbufinu, Oxykodónu a Noroxykodónu. Od nulej minúty zo 100 %A do 30 min. na 0 %A. V 30-60 min. 0 %A, 60-61 min. s lineárnou zmenou na 100 %A, 61-70 min. ekvilibrácia do pôvodných podmienok na 100 %A pri prietoku 1 mL/min. Pre ideálny chromatografický pík, ktorý má Gaussovský profil sa bolo nutné vyhnúť dvom najvýraznejším asymetriám: „frontovanie“ a chvostovanie „tailing.“ Ako kompenzáciu sme sa snažili vyvážiť gradient mobilnej fázy, prietokovú rýchlosť a jej pH. Pre ekvilibráciu kolóny medzi jednotlivými stanoveniami bolo vhodné spúšťať ďalšiu analýzu v 10 minútových intervaloch. Dávkovaný objem vzorky autosamplerom bol po celú dobu analýzy 10 µl. Takto vyvinutá metóda dosiahla dobrého rozlíšenia pri zachovaní akceptovanej dĺžky analýzy.

V nasledujúcej časti sme hodnotili základné validačné parametre: lineárny dynamický rozsah 0,3 – 4,5 µg/mL, vypočítali sme rovnicu lineárnej regresie pre Nalbufin R^2 (0,9999), Oxykodón R^2 (0,9999) a Noroxykodón R^2 (0,9998). Metóda nám poskytla limity detekcie pre Nalbufin 0,069 µg/mL. Oxykodón mal limit detekcie 0,053 µg/mL a Noroxykodón 0,048 µg/mL. Limity kvantifikácie v týchto prípadoch boli 0,209 µg/mL pre Nalbufin, 0,161 µg/mL pre Oxykodón a 0,147 µg/mL pre Noroxykodón. Stanovená bola aj opakovateľnosť pre limit kvantifikácie vyjadrená relatívnou smerodajnou odchýlkou. Pre Nalbufin - RSD= 0,40%, Oxykodón - RSD= 2,39% a Noroxykodón - RSD= 1,25%. Všetky tri stanovené analyty splnili podmienku, že $RSD \leq 7,0\%$. Nasledujúcim validačným parametrom bola presnosť. Výsledná hodnota RSD bola 0,44%, čo vyjadruje hodnotu, ktorá spĺňa maximálny povolený limit ($RSD \leq 5,0\%$). V rámci presnosti je popisovaná i reprodukovateľnosť, ktorou sa vyjadruje zhoda medzi jednotlivými laboratóriami. Tento parameter nebol v našom projekte hodnotený. Posledným hodnoteným validačným parametrom, bola robustnosť. Testy rôznych pH (2,4 a 2,6), nevykázali žiadne štatisticky významné rozdiely v RT analytov ani tvare pík na chromatograme. Hodnotená bola zmena rozlíšenia a opakovateľnosť s maximálnym

limitom do 5,0%. Pre pH 2,4 bola hodnota zmeny rozlíšenia 1,5% a opakovateľnosť RSD= 0,85%. Hodnota zmeny rozlíšenia pre pH 2,6 bola 2,8% a opakovateľnosť RSD= 1,29%.

Druhým sledovaným faktorom pre robustnosť bola zmena teploty kolóny. Teplota bola testovaná iba v jednom smere. Podmienky špecifikácie udávajú teplotu kolóny 50°C. Následným zvýšením teploty kolóny nad 50°C by mohlo prísť k jej znehodnoteniu a zničeniu. Pre teplotu 45°C bolo meranie zaznamenané šesťkrát. Z jednotlivých plôch pík bol vypočítaný aritmetický priemer a vyhodnotená relatívna smerodajná odchýlka RSD=3,45% spolu so zmenou rozlíšenia, ktorá mala hodnotu 3,34%

Test zmeny teploty kolóny v priebehu separácie nezaznamenal žiadne štatisticky významné rozdiely v RT analytov ani tvare pík na chromatograme.

Na záver konštatujeme, že vyvinutá chromatografická metóda bola overená v daných validačných parametroch a môžeme povedať, že je vhodná na stanovenie čistoty Nalbufin hydrochloridu.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] BRAITHWAITE, A., SMITH, F. J. *Chromatographic Methods*. S.1.: Springer Netherlands, 1996. ISBN: 978-07-514-0158-5.
- [2] WHELAN, W.J. *The Advent of Paper chromatography*. The FASEB Journal. 1995, Zv.9, ISSN: 08926638.
- [3] JANÁK, J., NOVÁK, J. Theoretical aspects of liquid chromatography. *Journal of chromatography library*. 1975, Zv.3, ISSN: 03014770.
- [4] MILLER, J.M. *Chromatography: concepts and contrasts*, 2nd ed. New Jersey: John Wileys and Sons, Inc, 2005. ISBN: 047-14-7207-7.
- [5] KUBÁŇ, V., KUBÁŇ, P. *Analýza potravín*. 1. vyd. Brno: MZLU, 2007. ISBN: 978-80-7375-036-7.
- [6] COUFAL, P. [online]. 1996, *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*. [cit. 17.2.2018]. Dostupné na internete: <<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.htm>>.
- [7] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [8] ŠTULÍK, K. a kol. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0852-9.
- [9] LEHOTAY, J. *Separace metody v analytické chemii*. 1. vyd. Bratislava: STU, 2009. ISBN 978-80-227-3036-5.
- [10] KARLÍČEK, R. a kol. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0348-9.
- [11] DOUŠA, M. [online]. 1999-2016, *Základní charakteristiky chromatografického procesu, HPLC*. [cit. 17.2.2018]. Dostupné na internete: <<http://hplc.cz/>>.
- [12] MRÁZOVÁ, V., MALIAROVÁ, M. *Laboratorne cvičenia z analytickej chémie*. Trnava: Univerzita sv. Cyrila a Metoda, 2012. ISBN 978-80-8105-354-2.
- [13] VIŠŇOVSKÝ, P., BEČKOVÁ, I.: *Bludný kruh toxikománií*. Hradec Králové: E.I.A., 1998. ISBN 80-85490-76-5.
- [14] BEČKOVÁ, I., VIŠŇOVSKÝ, P.: *Farmakologie drogových závislostí*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-864-6.
- [15] KALINA, K., ADAMČEK, D., BARTOŠÍKOVÁ, I., BAYER, D., BÉM, P.: *Drogy a drogové závislosti*. Praha: Úřad vlády České Republiky, 2003, ISBN 80-86734-05-6.
- [16] LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M.: *Farmakologie a toxikologie*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 80-247-0836-1

- [17] KVĚTINA, J., HERINK, J., VOPRŠÁLOVÁ, M.: *Základy farmakologie 2 díl*. 1. vyd. Brno: Farmaceutická fakulta, Ústav humánní farmakologie a toxikologie, 1999. ISBN 80-85114-45-3.
- [18] FRAŇOVÁ, S., ŠUTOVSKÁ, M.: *Farmakoterapia bolesti*. Martin: Univerzita Komenského, Jesseniova lékařská fakulta v Martine, 2014. ISBN 978-80-89544-78-3.
- [19] PARSONS, HA., SHUKKOOR, A., QUAN, H., et al. Intermittent subcutaneous opioids for the management of cancer pain. *Journal of palliative medicine*. 2018, vol. 11, p. 1319-1324.
- [20] LINCOVÁ, D., FARGHALI, H., et al: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [21] MIKEŠ, O.: *Laboratorní chromatografické metody*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1980. ISBN 04-614-80.
- [22] WESTON, A., BROWN, P.R., *HPLC and CE: Principles and Practice*. San Diego: Academic Press, 1997. ISBN 0-12-136640-5
- [23] BARTUŠEK, M., PAZOUREK, J. [online]. 2002, *Základy metod analytické chemie*. [cit. 24.2.2018]. Dostupné na internete: <http://analytika.byethost2.com/files/pdf/bartusek_skripta.pdf>.
- [24] Databáze PubChem. [online]. 2004, [cit. 25.2.2018]. Dostupné na internete: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nalbuphine#section=Chemical-and-Physical-Properties>>.
- [25] Databáze ChemSpider. [online]. 2015, [cit. 25.2.2018]. Dostupné na internete: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4470813.html>>.
- [26] Databáze RxList. [online]. 2016, [cit. 26. 2. 2018]. Dostupné z: <<https://www.rxlist.com/nubain-drug.htm#description>>.
- [27] COURTNEY, E.K., WORLEY, M., CASTO, N., TAPERT, F.T. The effects of alcohol on future drinking behavior and the development of alcohol problems. *Addictive Behaviors*. 2018, vol. 78, p.209-215
- [28] NEŠPOR, K., MATANELLI, O. [online]. 2011, *Interakce alkoholu a jiných látek: Komplikovaný problém*. [cit. 26.2.2018]. Dostupné na internete: <http://www.prolekare.cz/prakticky-lekar-clanek/interakce-alkoholu-a-jinych-latek-komplikovany-problem-36383>.
- [29] GROENENDAAL, D., BLOM-ROOSEMALEN, M.C.M., et al. High-performance liquid chromatography of nalbuphine, buprenorphine and morphine in blood and brain microdialysate samples: Application to pharmacokinetic/pharmacodynamic studies in rats. *Journal of Chromatography B*. 2005, vol. 822, p. 230-237.
- [30] SHUNG-TAI, H., JHI-JOUNG, W., YOA-PU HU, O., et al. Determination of nalbuphine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: application

to human and rabbit pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*.1996,vol. 678, p. 289-296.

[31] CAZANOVE, F., KINOWSKI, J., AUDRAN, M., et al. Determination of nalbuphine in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. 1997,vol. 690, p. 203-210.

[32] NICOLLE, E., MICHAUT, S., SERRE-DEBEAUVAIS, F., BESSARD, G. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic assay for nalbuphine in plasma. *Journal of Chromatography B*. 1995,vol. 663, p. 111-117.

[33] QUARRY, M.A., SEBASTIAN, D.S., WILLIAMS, R.C. Determination of Nalbuphine Hydrochloride, Methylparaben, and Propylparaben in Nalbuphine Hydrochloride Injection by High Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia*. 1998,vol. 47, no. 9/10.

[34] ATTIA, K.A., NASSAR, W.M., EL-OLEMY, A. Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Nalbuphine Hydrochloride. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*.2014,vol. 1, p. 15-22.

[35] SUCHÁNEK, M. *Kvalimetrie: 7. Validace analytických metod*. Praha: Eurochem, 1999, 140 s. ISBN 80 – 901868-4-X.

[36] PANTHEGHINI, M. – FOREST, J. C. Standardization in laboratory medicine. New challenges. *Clinica Chimica Acta*, 2005, vol. 355, issues 1-2, p. 1-12.

[37] BADAL, M. – FUKSA, J. K. – MEDEK, J. – KORUNA, I. – MOKRÝ, F. – PLZÁK, Z. – SUCHÁNEK, M. *Kvalimetrie*. Praha: Eurachem, 2000. 105 s. ISBN 80-901868-8-2.

[38] WIELING, J. – HENDRIKS, G. – TAMMINGA, W. J. – HEMPENIUS, J. – MENSINK, C. K. – OOSTERHUIS, B. – JONKMAN, J. H. G. Rational experimental design for bioanalytical methods validation. Illustration using an assay method for total captopril in plasma. *Journal of Chromatography*, vol. 730, 1996, , issues 1-2, p. 381-394.

[39] VOLKA, K. a kol. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.

[40] DOŠKÁŘOVÁ, Š. *Zajištění kvality analytických výsledků*. Sborník přednášek ze semináře 19. – 21. 3. 2001 a 11. – 13. 3. 2002. v Komorní Lhotce. Český Těšín: Theta, 2002. 308 s. ISBN 80-86380-11-4.

[41] SOMMER, L. *Teoretické základy analytické chemie III*. 1. vyd. Brno: VUT, 1995. 102 s. ISBN 80-214-0660-7.

[42] Validační program pro statistické zpracování analytických dat [online]. [cit. 25.3.2018]. Dostupné na internetu: <http://www.hplc.cz/validace/program_validace.htm>.

[43] KRUŽLICOVÁ, D. *Chemometria*. Trnava: 1. vyd. Univerzita sv. Cyrila a Metoda, 2015. 227 s. ISBN 978-80-8105-671-0.

[44] GREEN, M. J. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry*, 1996, vol. 68, issues 9, p. 305 – 309.

[45] SHAH, P. V.- MIDHA, K. K. – DIGHE, S. – MCGILVERAY, I. J. – SKELLY, J. P. – YACOBI, A. – LAYLOFF, T.- VISWANATHAN, C. T. – COOK, C. E. – MCDOWALL, R. D. – PITTMAN, K. A. – SPECTOR, S. Analytical Method Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1992, vol. 81, issues 3, p. 309 – 312.

[46] KRULL, I.- SWARTZ, M. Determining Limit of Detection and Quantification. *Validation View Point*, 1998, vol. 16, issues 10, p. 922 – 924.

[47] Databáza ChemSpider. [online]. 2015,[cit. 21.3.2018]. Dostupné na internete: <<http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=4514524>>.

[48] Databáza ChemSpider. [online]. 2015,[cit. 21.3.2018]. Dostupné na internete: <<http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=4447644>>.

[49] Databáza ChemSpider. [online]. 2015,[cit. 21.3.2018]. Dostupné na internete: <<http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=4470813>>.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A ZNAČIEK

7.1 Použité skratky

| skratka | z angličtiny | slovenský preklad |
|------------|--|---|
| ACN | <i>Acetonitrile</i> | Acetonitril |
| TEA | <i>Triethylamin</i> | Trietylamin |
| DAD | <i>Photodiode detector</i> | Detektor s poľom diód |
| MF | <i>Mobile phase</i> | Mobilná fáza |
| RSD | <i>Relative standard deviation</i> | Relatívna smerodajná odchýlka |
| SF | <i>Stationary phase</i> | Stacionárna fáza |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> | Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia |
| CNS | <i>Central nervous system</i> | Centrálny nervový systém |
| K | <i>Retention factor</i> | Retenčný faktor |
| MeOH | <i>Methanol</i> | Metanol |
| LC | <i>Liquid chromatography</i> | Kvapalinová chromatografia |
| LLC | <i>Liquid-liquid chromatography</i> | Chromatografia v systéme kvapalina-kvapalina |
| MF A | <i>Mobile phase A</i> | Mobilná fáza A |
| MF B | <i>Mobile phase B</i> | Mobilná fáza B |
| THF | <i>Tetrahydrofuran</i> | Tetrahydrofurán |
| HDL | <i>High density lipoproteins</i> | Vysokohustotné lipoproteíny |
| LOD | <i>Limit of detection</i> | Limit detekcie |
| LOQ | <i>Limit of quantification</i> | Limit kvantifikácie |
| EDTA | <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> | K. etyléndiaminotetraoctová |
| NBF | <i>Nalbuphine</i> | Nalbuphin |
| NP-HPLC | <i>Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography</i> | Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na normálnej fáze |
| R | <i>Correlation coefficient</i> | Korelačný koeficient |
| $R_{1,2}$ | <i>Resolution</i> | Rozlíšenie |
| R^2 | <i>Coefficient of determination</i> | Koeficient determinácie |
| RP-HPLC | <i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i> | Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na obrátenej fáze |
| $t'_{R,i}$ | <i>Reduced retention time</i> | Redukovaný retenčný čas |
| t_M | <i>Dead elution time</i> | Mŕtvy elučný objem |
| t_R | <i>Retention time</i> | Retenčný čas |
| UV | <i>Ultraviolet-visible</i> | ultrafialový |
| $w_{1/2}$ | <i>Half high peak</i> | Polovičná výška píku |
| w_i | <i>Width peak</i> | Šírka píku |